



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

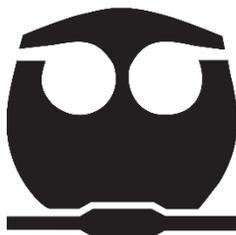
FACULTAD DE QUÍMICA

**TRANSFORMACIÓN DEL ACEITE DE LAS
SEMILLAS DE TORONJA (*Citrus paradisi*) PARA
LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIÉSEL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
ROSARIO GARCÍA GUERRERO**



Ciudad Universitaria, CDMX

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

VOCAL: **Profesor:** Ana Adela Sánchez Mendoza

SECRETARIO: **Profesor:** Benito Reyes Trejo

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Juan Manuel German Acacio

2° SUPLENTE: **Profesor:** Lino Joel Reyes Trejo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

División de estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM. Edificio B, Laboratorio L-208, Departamento de Química Orgánica

Universidad Autónoma de Chapingo, Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Preparatoria Agrícola

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Benito Reyes Trejo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Lino Joel Reyes Trejo

SUSTENTANTE:

Rosario García Guerrero

CONTENIDO

° INTRODUCCIÓN	1
° JUSTIFICACIÓN	3
° OBJETIVOS	4
<i>Objetivo general</i>	4
<i>Objetivos particulares</i>	4
° HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	5
1.1. Problemática mundial de abasto energético y su impacto al medio ambiente	6
1.2 Fuentes de energía renovable	9
1.3 Biocombustibles	10
1.3.1 Biocombustibles de primera generación	11
1.3.2 Biocombustibles de segunda generación	11
1.3.3 Biocombustibles de tercera generación	12
1.3.4 Biocombustibles de mayor producción y empleo	13
1.3.5 Ventajas y desventajas del uso de biocombustibles	13
1.4 Biodiésel	16
1.4.1 Residuos alimentarios para la producción de biodiésel	18
1.4.2 Almacenamiento del biodiésel	19

1.5 Obtención de biodiésel mediante el empleo de la reacción de transesterificación	20
1.5.1 Transesterificación en medio ácido	22
1.5.2 Transesterificación en medio básico	23
1.5.3 Transesterificación con uso de biocatalizadores	24
1.6 Parámetros de calidad del biodiésel	26
1.7 Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	29
1.7.1 Composición de la toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	30
1.7.2 Producción de toronja en México	31
1.8 Ciclopéptidos	31
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	34
2.1 Colecta de materia prima	35
2.2 Selección, limpieza y secado	35
2.3 Características físicas de las semillas	35
2.3.1 Determinación de humedad	35
2.4 Extracción del aceite de la semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	36
2.4.1 Método Soxhlet	36
2.4.2 Método de maceración	37
2.5 Reacción de transesterificación	39
2.6 Pruebas de calidad para la caracterización del aceite y el biodiésel	42
2.6.1 Índice de acidez	42
2.6.2 Índice de Yodo	42
2.6.3 Calor de combustión	43
2.6.4 Viscosidad	44
2.6.5 Densidad	45
2.6.6 Resonancia magnética nuclear ¹ H	45
2.6.7 Perfil de ésteres metílicos por Cromatografía de gases	45

2.7 Aislamiento y detección de posibles ciclopéptidos	46
2.7.1 Maceración hidroetanólica	46
2.7.2 Detección de péptidos y ciclopéptidos	46
2.7.2.1 Prueba de Ninhidrina	47
2.7.2.2 Prueba con Cl ₂ /o-tolidina	47
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS	48
3.1 Caracterización física de las semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	49
3.1.1 Determinación de humedad	49
3.2 Obtención del aceite de la semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>), mediante el empleo de los métodos Soxhlet y maceración	50
3.3. Caracterización del aceite de las semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	52
3.4 Obtención de biodiésel por transesterificación en medio básico	57
3.5 Caracterización del biodiésel	60
3.6 Mezclas diésel:biodiésel y su comparación con la Norma EN14214/07	66
3.7 Detección de ciclopéptidos en el bagazo de la semilla de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	69
° CONCLUSIONES	72
° BIBLIOGRAFÍA	73
° ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la materia prima de biomasa en las tres generaciones de biocombustibles.....	12
Figura 2. Ciclo del Biodiésel	17
Figura 3. Reacción de transesterificación.....	21
Figura 4. Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	29
Figura 5. Estructura de Annonuricatin B de <i>Annona muricata</i>	32
Figura 6. Reacción de Ninhidrina	33
Figura 7. Reacción de o-tolidina	33
Figura 8. Métodos de extracción del aceite de semillas de toronja	36
Figura 9. Reacción de transesterificación.....	39
Figura 10. Calorímetro empleado en la determinación de Calor de combustión .	43
Figura 11. Viscosímetro Anton Paar Stabinger SVM 3000	44
Figura 12. Aspecto de las semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>) seca	49
Figura 13. Producto de transesterificación. a) Cromatoplaaca a 90 min de reacción de transesterificación del aceite de semillas de toronja (maceración), b) Productos de transesterificación, biodiésel separados por diferencia de densidades (Parte superior biodiésel y glicerina en la inferior)	58
Figura 14. Cromatoplaaca con Ninhidrina, prueba para péptidos y aminoácidos...	70
Figura 15. Cromatoplaaca con Cl ₂ / o-tolidina, prueba para ciclopéptidos	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Producción energética mundial 2015.....	6
Gráfica 2. Producción mundial de petróleo 2017.....	7
Gráfica 3. Comparación del consumo de petróleo por sector entre los años 1973 y 2014	8
Gráfica 4. Materias primas utilizadas para la producción de biodiésel	19
Gráfica 5. Porcentaje de utilización de diversos catalizadores homogéneos para la producción de biodiésel.....	24
Gráfica 6. Comparación de rendimientos de aceite de semilla obtenidos por la extracción de Soxhlet entre distintas especies de cítricos.....	50
Gráfica 7. Comparación entre rendimientos de aceite de semilla de toronja (métodos de extracción Soxhlet y maceración).....	51
Gráfica 8. Calor de combustión del biodiésel, obtenido mediante el empleo de aceite extraído de semillas de toronja por los métodos Soxhlet y maceración.....	63
Gráfica 9. Relación porcentual de ésteres metílicos derivados de la transesterificación del aceite de toronja (aceite de maceración)	65
Gráfica 10. Variación de la densidad en las mezclas diésel: biodiésel en función de la temperatura	67
Gráfica 11. Variación de la viscosidad cinemática en las mezclas diésel:biodiésel en función de la temperatura	67
Gráfica 12. Variación del calor de combustión en las mezclas diésel:biodiésel en función de la temperatura.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de biocombustibles	15
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la catálisis ácida, básica y enzimática	25
Tabla 3. Composición de las semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>).....	31
Tabla 4. Dimensiones y masa de las semillas de Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	49
Tabla 5. Pruebas de calidad para el aceite de semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	52
Tabla 6. Índice de Yodo de aceites empleados en la obtención de biodiésel	54
Tabla 7. Calor de combustión de aceites de distintas especies usadas comúnmente en la producción de biodiésel.....	56
Tabla 8. Rendimiento de biodiésel respecto al método de extracción de aceite...	59
Tabla 9. Resultados de la caracterización del biodiésel de semillas de toronja, diésel petroquímico y norma europea EN 14214/07.....	60
Tabla 10. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos de especies usadas para producción de biodiésel comparados con los obtenidos del biodiésel de toronja.	64
Tabla 11. Normas EN 590 y ASTM D767.08 para mezclas B5 Y B20	68

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Proceso de extracción de aceite de semillas de toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	38
Diagrama 2. Proceso de obtención de biodiésel de aceite de semilla de toronja (<i>Citrus paradisi</i>), mediante la reacción de transesterificación	41

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

mdb	Miles de barriles diarios	h	hora
GEI	Gas de efecto invernadero	mL	mililitro
MTM	Millones de toneladas métricas	°C	Grados Celsius
AGL	Ácidos grasos libres	cal	Caloría
TAG	Triacilglicerol	KJ	Kilo Joules
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos	CCD	Cromatografía en capa delgada
NC	Número de cetano	SENER	Secretaría de Energía
CO	Monóxido de carbono	SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
CO₂	Dióxido de carbono	IEA	Agencia Internacional de la Energía (por sus siglas en inglés: International Energy Agency)
NO₂	Dióxido de nitrógeno	EN	European Standars
SO₂	Dióxido de azufre	ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (por sus siglas en inglés: American Society for Testing Materials)
NaOH	Hidróxido de sodio	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
KOH	Hidróxido de potasio	FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization)
HCl	Ácido Clorhídrico		
H₂SO₄	Ácido sulfúrico		
H₃PO₄	Ácido fosfórico		
I₂	Yodo		
Na₂SO₄	Sulfato de sodio		
Na₂S₂O₇	Tiosulfato de sodio		
MeOH	Metanol		
CH₃ONa	Metóxido de sodio		
CH₃OK	Metóxido de potasio		
TBHQ	Terbutilhidroquinona		
BHA	Butilhidroxianisol		
BHT	Butilhidroxitolueno		
N	Normalidad		
rmp	Revoluciones por minuto		
s	segundo		
cm	centímetro		
g	gramo		
mg	miligramo		

INTRODUCCIÓN

Actualmente el mundo atraviesa una crisis energética originada por el aumento de población, la demanda desmesurada de energía y las insuficientes reservas de petrolíferos; asimismo la contaminación ambiental y el aumento en los costos de energía se unen a dicha problemática. Los recursos no renovables descritos de esta forma por no generarse de forma constante como lo son los combustibles fósiles, se consideran la principal fuente energética del planeta pero se agotan gradualmente. Es por ello que en los últimos años se han buscado fuentes alternativas y sustentables de energía que respalden el empleo del petróleo. A pesar de que actualmente se cuenta con distintas opciones de energía renovable como la eólica, hidráulica y solar que además no dañan el medio ambiente, es necesaria la exploración de nuevas opciones para cubrir la demanda energética satisfactoriamente.

En los últimos años la biomasa ha generado un gran interés, ya que incluye un arsenal de opciones de insumos para la producción de energía mediante el uso de la llamada "basura orgánica". En el biodiésel se centra la principal atención de los biocombustibles, debido a sus características, tan similares con el diésel petroquímico, y a pesar de que actualmente su uso tenga una participación menor a nivel mundial, la producción de éste ha ido en aumento.

El biodiésel es producido a través de una reacción de transesterificación con el empleo de aceites vegetales y grasas animales. En los últimos años, las investigaciones acerca de su producción y utilización se han incrementado considerablemente, ya que a pesar de que sean generalmente los insumos como el aceite de colza, maíz y soya los más empleados en su producción, forma parte de una de las energías renovables en las que la materia prima principal también pueden ser aceites y grasas de residuo. Además, los estudios generados acerca de su empleo demuestran que disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero tales como el CO₂ y SO₂.

Sumado a los problemas de necesidad energética, se encuentra la inmensa generación de desechos orgánicos e inorgánicos que no tienen ningún uso, es por ello que si se logra proporcionar una segunda función a los residuos vegetales en la producción de biodiésel, se podría reducir la cantidad de desechos alimentarios. Como ejemplo de esto tenemos la producción de biodiésel con el empleo del aceite de cocina usado.

En el caso de la toronja (*Citrus paradisi*), su uso principal es el de la extracción de su jugo para consumo, dadas sus propiedades antioxidantes y su contenido de compuestos anti-inflamatorios y antivirales. Si bien existen estudios para el aprovechamiento de cáscara, el bagazo y la semilla de la toronja, a la fecha se tiene poca información respecto al empleo del aceite de la semilla para la producción de biodiésel.

Tomando en consideración las altas cantidades de toronja (*Citrus paradisi*), producidas, utilizadas y más tarde desechadas. En el presente trabajo se considera el uso del aceite contenido en las semillas de toronja (*Citrus paradisi*) para la producción de biodiésel, y su mezcla con diésel petroquímico para verificar su empleo en motores

JUSTIFICACIÓN

Hoy en día los combustibles fósiles son la principal fuente de energía mundial, tan solo en México se aproxima que el 88% de la energía primaria que se consume deriva del petróleo, pero debido a su gran demanda en las últimas décadas éstos se han agotado considerablemente, propiciando la exploración de fuentes renovables de energía que ayuden a cubrir la solicitud energética que va en aumento. Entre varias alternativas, el biodiésel ha generado un gran interés por sus propiedades similares al diésel petroquímico y por la amplia gama de materias primas que lo pueden producir, por lo que las investigaciones alrededor de su, generación, empleo y propiedades son cada vez mayores.

Por otra parte, la acumulación de residuos orgánicos también es un problema latente, por lo tanto si se plantea la utilización de éstos en la producción de biodiésel, se reduciría parcialmente la cantidad de residuos generados, produciendo un biocombustible limpio que respalde en buena medida la demanda energética. Se han propuesto residuos vegetales provenientes de semillas de mango, guanábana y mandarina por mencionar algunas.

La toronja tiene un lugar importante en la producción y utilización dentro del sector alimenticio tanto en México como en mundo. Después de la obtención del jugo de toronja, la cascara y pulpa son empleadas para la extracción aceites, esencias y aromas naturales. En general, y pese a que actualmente se han descubierto compuestos de interés biológico contenidos en las semillas de toronja, estas son desechadas en México. Sin embargo, las semillas de la toronja pueden utilizarse para extraer su aceite, a partir del cual puede producirse biodiésel mediante la reacción de transesterificación. Con lo anterior se pueden reducir los costos de producción de éste biocombustible por tratarse de un insumo de residuo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el aceite extraído de las semilla de Toronja (*Citrus paradisi*), para corroborar su uso potencial en la producción de biodiésel mediante una reacción de transesterificación, y con ello dar uso sustentable a los residuos generados por dicho cítrico, además de contribuir en la demanda energética.

Objetivos particulares

- Extraer y caracterizar el aceite de las semilla de *Citrus paradisi*
- Transformar el aceite extraído de las semillas de *Citrus paradisi* en biodiésel, mediante el empleo de una transesterificación alcalina
- Caracterizar el biodiésel obtenido del aceite de las semillas de *Citrus paradisi*
- Identificar la presencia de compuestos de interés biológico como péptidos y ciclopéptidos extraídos del bagazo de la semilla de *Citrus paradisi*, y con ello dar un uso integral a la semilla de toronja

HIPÓTESIS

El aceite extraído de la semilla de *Citrus paradisi* representará una fuente viable para la producción de biodiésel dadas sus propiedades fisicoquímicas, obteniendo biodiésel que cumpla con los estándares de calidad requeridos, con lo que generará una fuente de energía renovable y sostenible.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

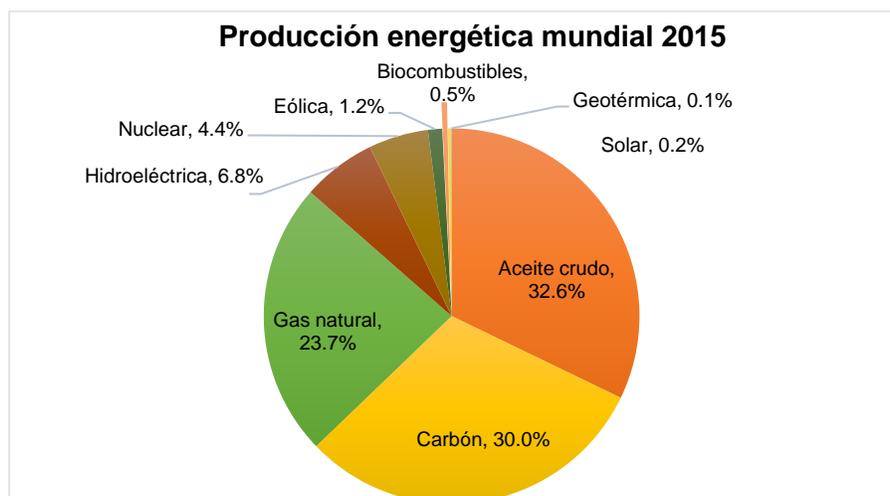
En el Capítulo I se aborda la problemática energética y el impacto que tiene en el medio ambiente, así como las posibles soluciones que han surgido a través de los años, entre ellas, la producción de biodiésel utilizando aceites no comestibles como materia prima. Además, se presentan los procesos de obtención de biodiésel y los parámetros de calidad que requiere dicho biocombustible.

1.1. Problemática mundial de abasto energético y su impacto al medio ambiente

El desmedido consumo energético actual representa una de las problemáticas de mayor importancia para la sociedad, ya que la movilidad en la mayor parte del mundo depende justamente del uso de energía. Cabe recordar que las crisis energéticas surgieron debido a la disminución en las reservas de los combustibles fósiles a finales de 1970 y principios de 1980 (Tücar *et al.*, 2014).

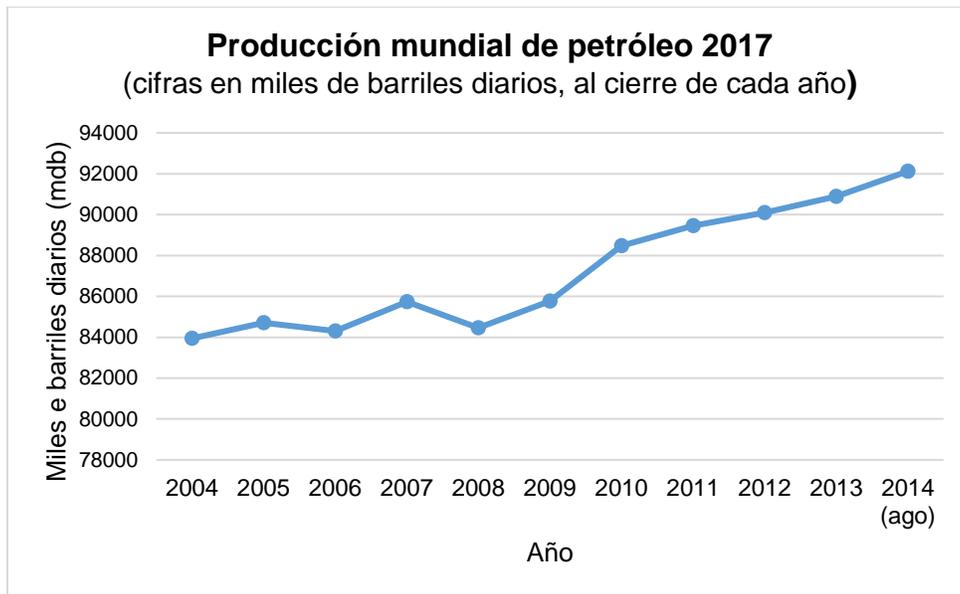
Hoy en día, los combustibles fósiles constituyen cerca del 80% de la energía consumida en el planeta. El aumento en el empleo de energía, aunado al calentamiento global que provocan las emisiones de CO₂, han propiciado la búsqueda de nuevas fuentes de energía que sean renovables y amigables con el medio ambiente para con ello, poder reemplazar al petróleo (Bardhan *et al.*, 2015).

Durante el año 2014, el petróleo permaneció como la principal fuente de energía a nivel mundial y en el año 2015 su consumo se ubicó en 92,086 mbd (millones de barriles diarios), que representan el 32.6% de la demanda energética total. Después del petróleo, en segundo lugar se encuentra el carbón con 30.0%, seguido del gas natural con una participación del 23.7%, la hidroenergía con 6.8%, la energía nuclear con 4.4% y, por último, las energías renovables con apenas un 2.5% de uso, ver Gráfica 1 (SENER, 2015).



Gráfica 1. Producción energética mundial 2015
Elaboración propia con datos recuperados de SENER 2015

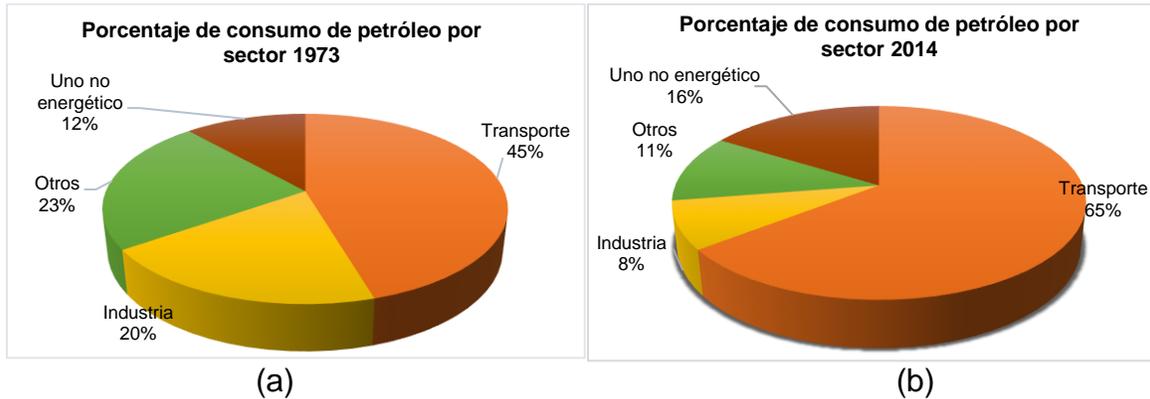
Para 2017, la producción de petróleo ha incrementado con la finalidad de abastecer los requerimientos de consumo de energía consecuencia del aumento de la población y el desarrollo económico y social. En la Gráfica 2 se observa el aumento en la producción mundial de petróleo hasta el año 2014. Dado que dicha producción crece desmedidamente, las reservas de éste combustible disminuyen de igual forma, por lo que se pronostica que lleguen a su fin durante el próximo medio siglo (WEC, 2013).



Gráfica 2. Producción mundial de petróleo 2017
Datos recuperados de: El financiero, 2017

Por otra parte, el crecimiento en la demanda mundial del petróleo desde 1980, proviene en su mayor parte del sector transporte (autotransporte, aviación, trasbordadores marinos, etc.), y se pronostica que este sector continúe su demanda con un crecimiento dominante (SENER, 2013). A nivel mundial el sector transporte, además de ocupar un lugar importante en el consumo energético, es responsable del 23% de todas las emisiones de CO₂, por lo que el uso de biomasa para la producción de biocombustibles es una manera de reducir tanto el consumo de petróleo crudo, como la contaminación ambiental (Demirbas *et al.*, 2016).

Con los porcentajes de consumo de petróleo encontrados en la Gráfica 3, se realiza una comparación en donde se observa un incremento en el consumo de combustibles fósiles en el sector transporte, que va de 45% de uso en el año 1973, hasta un 65% para 2014.



Gráfica 3. Comparación del consumo de petróleo por sector entre los años 1973 y 2014
 a) Porcentaje de consumo de petróleo por sector en el año 1973
 b) Porcentaje de consumo de petróleo por sector en el año 2014

Datos recuperados de: IEA, 2016. Key world energy statistics. International Energy Agency

La situación actual ha vuelto necesaria la búsqueda de opciones que sustituyan la gasolina y el diésel por biocombustibles producidos con materia prima como aceites no comestibles, algas y desechos. Estos últimos, representan una fuente viable ya que no comprometen cultivos alimenticios y contribuyen con el manejo de residuos dando un segundo uso a estos, lo cual a su vez también soluciona un problema con la generación descontrolada de los residuos alimentarios (Verma y Sharma, 2016). En los últimos años la biomasa se ha posicionado como una materia prima factible para sustituir a los combustibles fósiles y así, poder cubrir las necesidades del sector energético satisfactoriamente (Bardhan *et al.*, 2015).

Los aceites vegetales usados directamente en motores puede causar problemas de ingeniería debido a su alta viscosidad, pero este problema puede ser solucionado mediante la reacción de transesterificación del aceite para producir biodiésel, producto que ha mostrado tener propiedades de combustible similares a las del diésel petroquímico, además de disminuir las emisiones de CO₂ (Verma y Sharma, 2016).

1.2 Fuentes de energía renovable

El propósito de la generación de energías renovables es usar fuentes no finitas además de disminuir o anular las emisiones de CO₂, por lo que éstas energías resultan más atractivas frente a las generadas con combustibles fósiles, aunado a que ofrecen un respaldo al abastecimiento energético (Jarauta, 2014).

A pesar del creciente empleo de energías renovables, éstas aun representan un porcentaje minoritario frente a los combustibles convencionales obtenidos del petróleo (Díaz, 2015). Entre estas energías encontramos:

- *Hidráulica*. Producida por la transformación de corrientes de agua a energía cinética si está en función de su velocidad, o potencial por la diferencia de alturas de corrientes fluviales, mediante el empleo de generadores y turbinas.
- *Eólica*. Aprovecha las grandes velocidades de las corrientes de aire a través de aerogeneradores y aeroturbinas, con el propósito de obtener energía eléctrica limpia.
- *Solar*. Lo que realmente es usado es la radiación solar (luz, calor y rayos ultravioleta), que llega a la superficie de la tierra proveniente del sol. Esta energía centra su principio en la concentración de radiación solar en un receptor. De acuerdo con el proceso utilizado, al tipo de energía solar obtenido se le denomina:
 - Fotovoltaica. Que es la producción directa de electricidad mediante materiales semiconductores.
 - Termoeléctrica. Dada por la generación de vapor para la movilidad de una turbina, y con ello generar electricidad.
 - Térmica. Producida por el calentamiento de fluidos.
- *Energía geotérmica*. Consiste en capturar el calor existente bajo la tierra, a través de la perforación de acuíferos o la impulsión de agua fría entre rocas calientes, hasta obtener agua caliente o incluso vapor, dicho vapor es conducido a la superficie mediante turbogeneradores para su aprovechamiento.

- *Energía obtenida de la biomasa.* Cualquier materia orgánica, derivada de plantas o animales sobre una base renovable, en donde se incluyen madera, cultivos agrícolas y energéticos y residuos orgánicos.

1.3 Biocombustibles

Los biocombustibles surgen a fines del siglo XIX y nacen con el uso de los hidrocarburos como fuente de energía. El Dr. Rudolf Diésel desarrolló el primer motor diésel, que estaba diseñado para que funcionara con aceites vegetales (Salinas y Gasca, 2009).

Hoy en día los biocombustibles se definen como combustibles sólidos, líquidos y gaseosos, producidos a partir de biomasa (residuos de alimentos, cultivos agrícolas, desechos municipales y subproductos agrícolas y forestales). Estos pueden ser utilizados como combustibles sustitutos a los ya tradicionales obtenidos del petróleo (IEA, 2016). Este concepto abarca una variedad de productos como bioetanol, biodiésel, biohidrógeno, bioéter y biogás, entre otros.

Durante la última década, los biocombustibles han surgido como una fuente alternativa de energía renovable y sostenible que, además, cumple con tres aspectos importantes para su uso: producción energética, desarrollo económico y protección al medio ambiente. Según la revisión estadística de la energía mundial, en el decenio de 2002 a 2012 se incrementó 6 veces la producción de biocombustibles (Harish *et al.*, 2015).

La producción mundial de biocombustibles ha crecido rápidamente en los últimos años, pasando de 18 mil millones de litros en el año 2000 a 110 mil millones de litros en el año 2013 y se espera que llegue a 140 mil millones de litros para el 2018. El consumo actual de biocombustibles para uso en transporte es de 3.5% frente a los combustibles fósiles. A pesar de que la mayoría de los biocombustibles líquidos se produce en forma de bioetanol (aproximadamente el 80%), el resto constituye el biodiésel, y es la industria de este último, uno de los mercados con mayor crecimiento en los últimos años (Demirbas *et al.*, 2016).

Los biocombustibles son clasificados como primarios y secundarios, se entiende como combustibles primarios a aquellos que se utilizan de forma no procesada, empleados principalmente para calefacción o cocción, tal como la madera, los desechos de animales o los residuos de cultivos; mientras que los biocombustibles secundarios se generan a partir de biomasa. Los biocombustibles se denominan según la tecnología empleada para su desarrollo y la materia prima utilizada, como de: primera, segunda y tercer generación (Singh *et al.*, 2011).

1.3.1 Biocombustibles de primera generación

Producidos a partir de grasas animales y cultivos alimentarios que cuentan con altos contenidos de almidón, azúcar y aceites (Fig. 1). Las tecnologías empleadas para la producción de dichos biocombustibles se basan principalmente en la fermentación de azúcares y transesterificación para las grasas y los aceites. Ejemplos de biocombustibles de primera generación son el bioetanol, biogás y biodiésel, en esta primera generación se muestra grandes disminuciones en las emisiones de CO₂, lo cual resulta atractivo para el cuidado del medio ambiente (Harish *et al.*, 2015).

1.3.2 Biocombustibles de segunda generación

Son obtenidos mediante el uso de especies de cultivos no comestibles y desechos forestales (Fig. 1), lo cual representa una ventaja frente a los biocombustibles de primera generación, pues no comprometen el uso de cultivos utilizados para el consumo humano, además, la biomasa disponible es mayor por ser de desecho. La lignina, celulosa y hemicelulosa son algunos de los componentes buscados en las materias primas empleadas y pueden encontrarse en la paja, la madera y la hierba, también se emplean aceites no comestibles y residuales. Dentro de esta generación se producen biometano, por digestión anaerobia; los productos de la hidrólisis enzimática generan bioetanol; y biodiésel, por transesterificación (Singh *et al.*, 2011).

1.3.3 Biocombustibles de tercera generación

Desde hace tiempo las algas se incluyeron en la segunda generación de materias primas, aunque dada su capacidad para crecer en tierras no cultivables y de sobrevivir a una diversidad de carbono, fue necesaria la inclusión de una tercera generación de biocombustibles (Fig. 1) (Bardhan *et al.*, 2015). En esta generación, la producción de biodiésel con el uso de algas, cianobacterias y cultivos no alimentarios son la principal fuente de producción. A pesar de no presentar competencia con el uso de los cultivos alimentarios, y de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, dicha generación, a excepción de las algas verdes, compromete las tierras de cultivo para la siembra de insumos (Rodionova *et al.*, 2017).

Actualmente, se visualiza una cuarta generación de biocombustibles, producidos a partir de bacterias con ADN recombinante que incluyen CO₂ como fuente de carbono, en esta nueva tecnología, es la bacteria modificada la que lleva a cabo todo el proceso de formación de biocombustible.

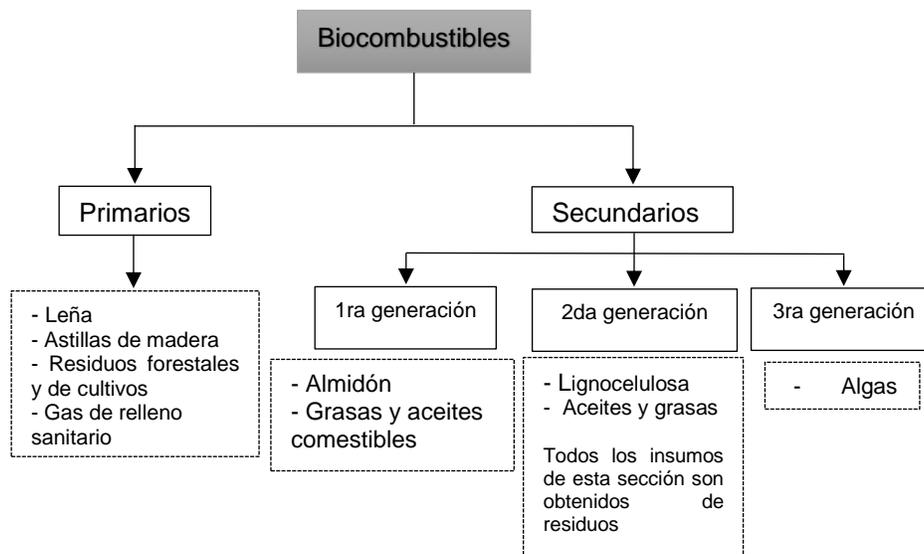


Figura 1. Clasificación de la materia prima de biomasa en las tres generaciones de biocombustibles. Fuente: Singh *et al.*, 2011

1.3.4 Biocombustibles de mayor producción y empleo

Frente a la gama de biocombustibles tan variada que existe en la actualidad, los dos más empleados mundialmente son el etanol y el biodiésel, que se utilizan principalmente en los motores de vehículos como automóviles y camiones (Espinoza *et al.*, 2009). El biogás también se ha posicionado como uno de los biocombustibles de mayor empleo. A continuación se describen los biocombustibles mencionados:

- *Bioetanol*. Alcohol etílico producido a través de la fermentación de azúcares obtenidos de materia orgánica y del almidón presente en los cereales (Harish *et al.*, 2015).
- *Biodiésel*. Obtenido por la reacción de transesterificación de lípidos naturales, está compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites vegetales o grasas animales
- *Biogás*. Éste se produce mediante una digestión anaerobia, siendo una mezcla gaseosa formada principalmente de metano y dióxido de carbono, además de diversas impurezas (FAO, 2011).

1.3.5 Ventajas y desventajas del uso de biocombustibles

Cada día resulta más evidente la capacidad de los biocombustibles como fuente de energía renovable, por lo que actualmente se busca la optimización y mejora de procesos de producción y nuevas fuentes de insumos para su obtención (Rodionova *et al.*, 2017).

La producción de biocombustibles ofrece seguridad energética principalmente a los países que carecen de petróleo, y puesto que todos los países tienen la capacidad de producir biomasa vegetal o animal y por lo tanto biocombustibles, la producción de éstos pueden brindar cierta independencia del petróleo (Espinoza *et al.*, 2009).

Asimismo, es importante entender que al proponer un sustituto de los combustibles fósiles se debe comprobar su aptitud y disponibilidad, así como las posibles ventajas y desventajas que conlleve. Y es que si bien, los biocombustibles ofrecen de manera general ventajas muy atractivas tales como la sustentabilidad: reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), seguridad en el suministro, fácil transportación, biodegradabilidad, entre otras. También deben tomarse en cuenta los deméritos que presentan, como el origen de la materia prima empleada y el proceso de obtención del biocombustible (Ahmad *et al.*, 2011).

Si se toma en cuenta la existencia de las tres generaciones de biocombustibles, se comprende mejor que justo por el origen de los insumos para su generación, los biocombustibles conciben ventajas y desventajas distintas, dependiendo si el insumo de producción es de origen alimentario o no alimentario, o en otro caso, si para la producción de biocombustibles se hace uso de material residual. En la Tabla 1 se exponen las ventajas y desventajas para cada una de las tres generaciones de biocombustibles (Salinas y Gasca, 2009). En esta comparación se entiende que la segunda generación de biocombustibles es la más viable y sostenible, ya que en ésta no se utilizan cultivos alimentarios, además de disminuir los costos de producción por el uso de materia prima no comestible y de residuos alimentarios.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de biocombustibles

Ventajas	Desventajas
Primera generación	
<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en la dependencia de combustibles fósiles • Mayor adaptación a la tecnología existente 	<ul style="list-style-type: none"> • Crisis alimentaria • Mayor costo de alimentos, dado que una parte de estos se desvía para la producción de biocombustibles • Mayor consumo de agua en la producción • Uso excesivo de suelo para el cultivo de materia prima • Altos costos de producción del biocombustible obtenido
Segunda generación	
<ul style="list-style-type: none"> • Se dispone de mayor cantidad de materias primas • Uso de cultivos no comestibles, residuos alimentarios e industriales como materia prima • Dado el uso de desechos alimentarios ayuda al control de su generación excesiva • Disminuyen las emisiones de GEI • Bajo consumo de agua en su producción • Bajo costo del biocombustible 	<ul style="list-style-type: none"> • Comprometen suelos de cultivo alimentario al emplear terrenos destinados a la producción de biodiesel • Empleo de altas cantidades de materia prima • Altos costos de producción
Tercera generación	
<ul style="list-style-type: none"> • Uso de cianobacterias y algas para su producción • No comprometen áreas de cultivos alimentarios 	<ul style="list-style-type: none"> • Altos costos de producción • Empleo de nuevas tecnológicas

1.4 Biodiésel

Este biocombustible está compuesto por una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga, derivados de aceites vegetales o grasas animales, que son básicamente triacilgliceroles (TAG), éste constituye un combustible alternativo de combustión limpia, sujeto a un proceso químico llamado transesterificación, en donde también se obtiene glicerina como subproducto. El término biodiésel alude al combustible puro denominado B100, que si bien puede usarse de forma directa, con mayor frecuencia es empleado en mezclas con diésel convencional. El interés en su producción radica en su capacidad de renovarse y en la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (Banković-Ilić *et al.*, 2014).

En los últimos años, el biodiésel ha sido considerado como el mejor candidato para una sustitución del combustible diésel ya que es renovable. Además, al presentar propiedades fisicoquímicas similares al diésel, este combustible puede mezclarse con el gasóleo fósil o utilizarse como combustible puro sin cambiar el diseño de los motores (Haseeb *et al.*, 2011). Además, la mayoría de materias primas para su producción, provienen de aceites comestibles y no comestibles; aceites vegetales como la canola, soja y maíz se han utilizado para su producción obteniendo resultados satisfactorios, al igual que el uso de aceite de cocina de desecho y grasas animales (Mobida *et al.*, 2015).

Los buenos resultados obtenidos tras el uso de aceites vegetales para la producción de biodiésel, se deben a que éstos presentan disponibilidad inmediata, portabilidad por ser líquidos, renovabilidad, menor contenido de azufre y compuestos aromáticos y biodegradabilidad. A pesar de los diversos atributos que justifican el empleo de aceites vegetales, existen inconvenientes en sus características que entorpecen su generación y empleo, tales como una mayor viscosidad que obstaculiza la atomización del combustible al requerir más energía para bombearlo, mayor costo (para los aceites comestibles) , menor volatilidad, la reactividad de las cadenas de hidrocarburos insaturados, la limitación de uso frente a climas fríos y mayor desgaste en el motor (Demirbas *et al.*, 2016).

Un análisis del ciclo de vida del biodiésel mostró que las emisiones globales de CO₂ se redujeron en un 78% en comparación con el diésel petroquímico. Aunque el biodiésel no puede reemplazar por completo el combustible diésel de origen fósil, hay razones que justifican su desarrollo (Gerpen, 2005):

1. Proporciona un mercado a los aceites vegetales no comestibles, la producción de grasas animales y los residuos alimentarios.
2. Disminuye, mas no elimina, la dependencia en el uso de combustibles fósiles.
3. Es renovable y no contribuye con el calentamiento global debido a su cerrado ciclo de carbono (Fig. 2)
4. Las emisiones de gases de escape de CO, hidrocarburos no quemados y emisiones de partículas de biodiésel son menores que en el combustible diésel convencional.
5. Al mezclar diésel petroquímico con biodiésel se pueden mejorar las propiedades lubricantes.



Figura 2. Ciclo del Biodiésel

Fuente: <http://www.effika.com/biodiesel/>

Actualmente alrededor del 34% del aceite comestible se destina a la producción de biodiésel y se incrementará en el futuro. Residuos de aceite de cocina y aceites no comestibles en la producción de biodiésel podrían ser fuentes alternativas (Selvaraj *et al.*, 2016).

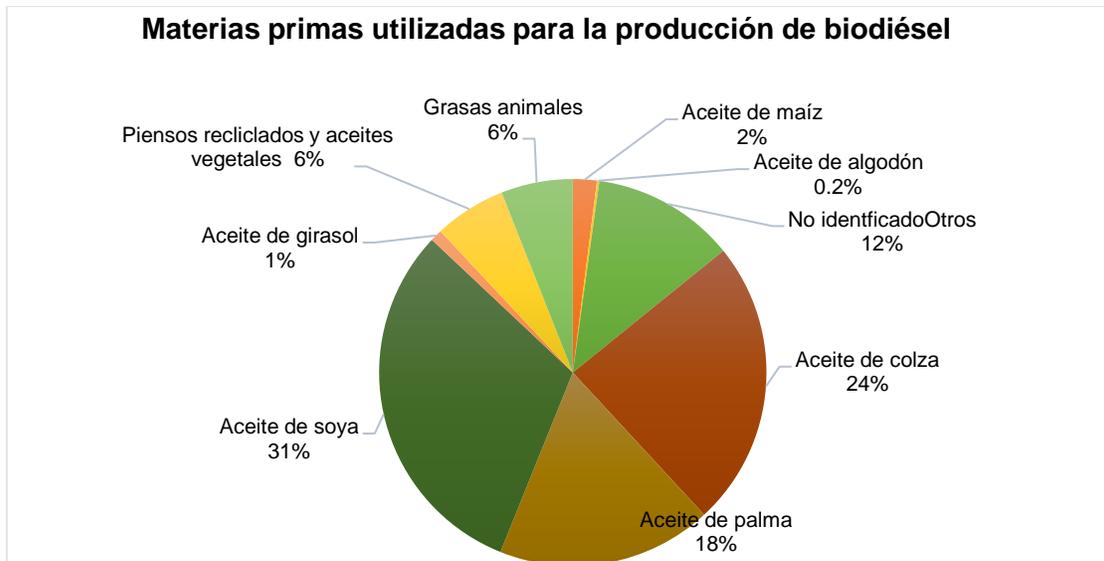
1.4.1 Residuos alimentarios para la producción de biodiésel

Las materias primas para la producción de biodiésel pueden dividirse en cuatro grupos: aceites vegetales (comestibles y no comestibles), grasas animales, aceites de cocina usados y algas (Banković-Ilić *et al.*, 2014). Entre las principales materias primas utilizadas para su producción se encuentra el aceite de palma, soya y la colza.

Sin embargo, a pesar de la gran producción de aceite de palma (54 millones de toneladas mundiales), sólo el 7,5% de su oferta se utiliza para la producción de biodiésel. Respecto al aceite de colza y al aceite de soja, aproximadamente el 20% y el 15%, respectivamente, se utilizan para propósitos de biodiésel. El aceite de maíz se utiliza para producir hasta 450 mil toneladas de biodiésel en los Estados Unidos, colocando este aceite como una materia prima importante en la producción de dicho biocombustible. Sin embargo, al ser un cultivo alimentario y tener un valor comparativamente alto en el mercado, el maíz no es una materia prima prometedora (Souza *et al.*, 2017).

Sería particularmente ventajoso utilizar fuentes no comestibles y no refinadas de los aceites vegetales. Esto superaría cualquier desafío de los mercados existentes basados en la alimentación y aumentaría aún más el potencial económico de la producción de biodiésel (Nordblad *et al.*, 2016). Por lo tanto, con el propósito de no utilizar cultivos empleados en la producción de alimentos, se buscan materias primas grasas de residuo para verificar su potencial en la producción de biodiésel. Además, la producción de biocombustibles líquidos a partir de residuos alimentarios contribuye al empleo de dichos residuos, cuya eliminación es cada vez más difícil (Kumar, 2016).

En la Gráfica 4, se muestra la distribución porcentual de las diferentes materias primas usadas para la obtención de biodiésel, donde se puede observar que el uso de piensos reciclados y los aceites vegetales alcanzan el 6% de dicho porcentaje de materias primas.



Gráfica 4. Materias primas utilizadas para la producción de biodiésel
Fuente: Souza et al, 2017

Los principales insumos empleados en la producción de biodiésel son el aceite de soya, palma y colza, y en menor cantidad están el sebo de vacuno, el aceite de freír, la manteca de cerdo, la grasa de pollo y otros materiales grasos (Souza *et al.*, 2017).

1.4.2 Almacenamiento del biodiésel

A pesar de sus muchas ventajas, el biodiésel presenta deficiencias durante su almacenamiento con respecto al diésel convencional (Dunn, 2008), por lo que hay factores que son tomados en cuenta para un confinamiento apropiado. La temperatura de almacenamiento del biodiésel puro se mantienen en un intervalo de 7-10 °C para evitar la formación de cristales que pudieran tapar las líneas y los filtros de combustible (Leung *et al.*, 2010).

La estabilidad del biodiesel es una propiedad importante cuando se va a almacenar durante un período prolongado, una mala estabilidad puede conducir a un aumento del valor de acidez y la viscosidad del combustible a la formación de gomas y sedimentos (Leung *et al.*, 2010), además de cambios de color, dependiendo del tipo y cantidad de materiales inestables presentes (Dunn, 2008).

Puesto que el biodiésel está caracterizado por una concentración alta de ácidos grasos insaturados que a pesar de mejorar las propiedades de flujo en frío, pueden degradarse durante el almacenamiento prolongado por mecanismos de oxidación y autooxidación, generados por la presencia de aire, luz, temperaturas altas y ácidos grasos libres (Dunn, 2008). Asimismo, la humedad debe minimizarse durante el almacenamiento, aunque es importante considerar que el contenido de humedad sólo aumenta si el biocombustible se almacena en condiciones de exposición al aire o en almacenamiento a altas temperaturas (Zakaria *et al.*, 2013).

Un mal almacenamiento puede afectar la acidez ya que cuanto mayor sea la duración o la temperatura durante éste, el valor de la acidez incrementa, de la misma forma que cuando el biodiésel tienen exposición a la luz del sol (Zakaria *et al.*, 2013). Además del control de temperatura, o la reducción de luz durante el almacenamiento del biodiésel, deben seleccionarse tanques fabricados de aluminio, acero, teflón y polietileno fluorado o polipropileno (Leung *et al.*, 2010).

Si la duración del almacenamiento del biodiésel o mezclas es mayor a 6 meses, deben tratarse con un aditivo antioxidante (Leung *et al.*, 2010). Los antioxidantes pueden derivarse de fuentes naturales o sintéticas aunque en la industria del biodiésel se prefieren los antioxidantes sintéticos porque tienden a ser más eficaces. Los antioxidantes más utilizados en el biodiésel son los sintéticos como el TBHQ, BHA, BHT, PrG y pirogalol y en menor proporción los antioxidantes naturales como los tocoferoles (Dunn, 2008).

1.5 Obtención de biodiésel mediante el empleo de la reacción de transesterificación

La generación de biodiésel a partir de la reacción de transesterificación con la ayuda de un catalizador es un método muy empleado, de forma general, se describe como la reacción entre un alcohol (generalmente metanol o etanol) y un lípido (aceite vegetal, aceite de alga o grasas animales) en presencia de un catalizador (Fig. 3) (Ruhul *et al.*, 2015). Esta reacción produce ésteres de ácidos grasos

mediante un proceso de tres etapas, donde los triacilglicéridos se transforman inicialmente a diglicéridos, los cuales en una segunda etapa producen monoglicéridos y finalmente los monoglicéridos generan glicerina. La mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos es conocida como biodiésel (Gerpen, 2005).

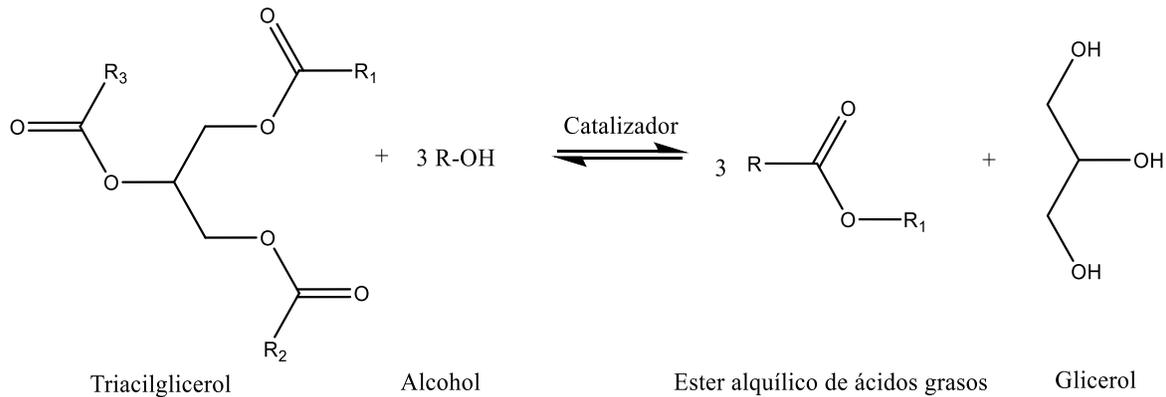


Figura 3. Reacción de transesterificación

Para llevar a cabo estequiométricamente la reacción de transesterificación es necesario una relación molar 3:1 de alcohol/triglicérido. Aunque en investigaciones recientes se sugiere que la proporción de alcohol sea mayor con la finalidad de obtener un mayor rendimiento (Ajala *et al.*, 2014).

La optimización de la reacción está influenciada por varios parámetros, con el objetivo de incrementar el rendimiento y reducir los costos de reacción. La relación molar de alcohol/triglicérido, temperatura de reacción, concentración del catalizador, y tiempo tienen un efecto sobre la conversión a biodiésel. Existen estudios que indican que los valores óptimos para la transesterificación en medio básico son: temperatura de 60 °C, <1% m/m de catalizador respecto al aceite empleado, y proporciones 6:1 de alcohol/triglicéridos durante 60 minutos (Banković-Ilić *et al.*, 2014).

En general, hay tres categorías de catalizadores utilizados para la producción de biodiesel: álcalis, ácidos y enzimas (Leung *et al.*, 2010). Los catalizadores alcalinos y ácidos incluyen catalizadores homogéneos (en la misma fase líquida que el aceite) y heterogéneos (usados en fase sólida o gas), cuya selección depende del

contenido de AGL (ácidos grasos libres) del aceite. Aunque la reacción de transesterificación se realiza con mayor frecuencia con catalizadores homogéneos también pueden aplicarse catalizadores heterogéneos como bases metálicas sólidas y catalizadores naturales de arena ácida sólida (Banković-Ilić *et al.*, 2014). A continuación se describen los procesos de transesterificación por catálisis ácida, básica y enzimática:

1.5.1 Transesterificación en medio ácido

Estos catalizadores incluyen H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl o ácido sulfónico orgánico. En comparación con el proceso de base catalizada, el uso de catalizadores ácidos en los procesos de transesterificación de triacilglicerol implica mucho más tiempo de reacción y mayor relación molar de alcohol: aceite, asimismo, otra desventaja presentada en este tipo de reacciones es la de generar agua que impide que la reacción se complete de forma satisfactoria (Banković-Ilić *et al.*, 2014).

Sin embargo, las transesterificaciones catalizadas con ácido poseen una ventaja importante con respecto a las catalizadas en medio básico, puesto que el rendimiento del catalizador ácido no se ve afectado por la presencia de AGL en la materia prima. Los catalizadores ácidos pueden simultáneamente catalizar el proceso de esterificación y transesterificación (Tariq *et al.*, 2012), siendo el proceso de esterificación mucho más rápido, lo cual sugiere que este tipo de catálisis se recomiende para aceites con un contenido de AGL mayor.

A pesar de los méritos que presenta la catálisis ácida, también existen desventajas que indican que dicho método no es el más viable para la obtención de biodiésel, (ver Tabla 2). La cantidad de catalizador ácido influye en el rendimiento del biodiésel, con una concentración creciente, el rendimiento de FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos) en primer lugar aumenta hasta el valor máximo y posteriormente disminuye, independientemente del origen de la grasa y la temperatura de reacción (Banković-Ilić *et al.*, 2014). Al no verse afectada la catálisis ácida por los AGL, los insumos empleados suelen ser aceites de cocina usados, y aceites de bajo costo.

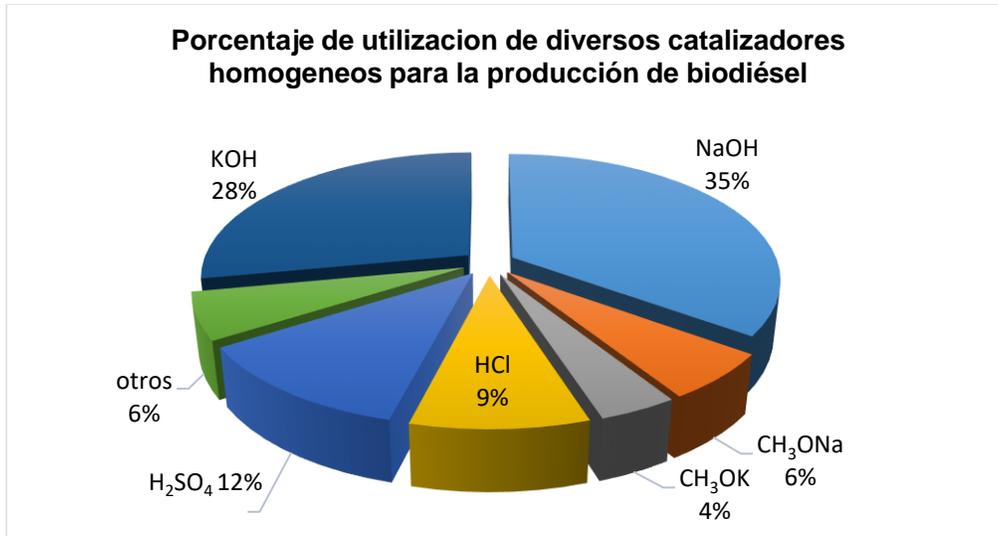
1.5.2 Transesterificación en medio básico

Entre los catalizadores alcalinos más comunes se encuentran KOH, NaOH, NaOCH₃ y KOCH₃. Un catalizador alcalino es adecuado para aceites que tienen menos del 3% en peso de AGL, ya que a un valor mayor los catalizadores forman jabones mediante saponificación, además de dificultar la separación del glicerol del producto (Helwani *et al.*, 2009). Los catalizadores básicos incluyen hidróxidos de metales alcalinos, alcóxidos y carbonatos de sodio o potasio. El costo de producción de los catalizadores es bajo, con alto rendimiento, y se utilizan materias primas que contienen una baja cantidad de AGL. Un límite de <3% de nivel de AGL en aceites ha sido reportado como aceptable para aplicar la catálisis alcalina homogénea, si es más alto (Selvaraj *et al.*, 2016).

La catálisis básica es más económica debido a que el procedimiento se lleva a cabo a baja temperaturas (40-60°C), menor tiempo de reacción (30-90 minutos) y baja presión atmosférica, además, la tasa de conversión es alta y sin pasos intermedios. Sin embargo, los catalizadores alcalinos homogéneos son altamente higroscópicos y absorben el agua del aire durante el almacenamiento, asimismo forman agua cuando se disuelven en alcohol y afectan el rendimiento, por lo que deben ser manejados apropiadamente (Tariq *et al.*, 2012).

En la Tabla 2, se exponen las ventajas y desventajas que presenta la transesterificación en medio básico, lo cual nos indica las razones por las cuales ésta resulta la más conveniente para la obtención de biodiésel.

Debido al bajo costo de las materias primas, el NaOH y KOH se usan generalmente como catalizadores alcalinos homogéneos y la transesterificación alcalinizada es más común (Leung *et al.*, 2010). En la Gráfica 5 se exponen los porcentajes de utilización de los catalizadores homogéneos más comunes.



Gráfica 5. Porcentaje de utilización de diversos catalizadores homogéneos para la producción de biodiésel. Fuente: Ajala *et al.*, 2014

1.5.3 Transesterificación con uso de biocatalizadores

También llamados enzimas o catalizadores enzimáticos, estos se obtienen de organismos vivos y promueven reacciones químicas sin verse afectados. Este tipo de catalizadores están presentes en la mayoría de las reacciones bioquímicas en células vivas. Recientemente se han empleado en la generación de biodiésel, ya que implican algunas ventajas frente a otros catalizadores, como por ejemplo, evitan la formación de jabones y el proceso se lleva a cabo a temperaturas bajas (35-45 ° C), además de la reutilización de las enzimas al inmovilizarlas en soportes sólidos. A pesar de que las reacciones son lentas y de alto costo, presentan la ventaja de ser insensibles a los ácidos grasos libres y al contenido de agua de la materia prima (Ruhul *et al.*, 2015).

Las lipasas han sido las principales enzimas utilizadas como biocatalizadores de la transesterificación ya que son más baratas, además pueden separarse de diferentes fuentes de especies bacterianas, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, y *Candida antártica*. Debe mencionarse que la biocatálisis solo se recomienda para insumos con alto contenido de AGL (Semwal *et al.*, 2011).

Aunque factores como la temperatura debe ser tomados en cuenta, ya que a temperaturas mayores a 50 °C la desnaturalización de la estructura proteica de la enzima ocurre, lo que resulta en una caída en la actividad y la velocidad de reacción, y esto propicia un rendimiento bajo (Taher, H. y Al-Zuhair, 2016). En la Tabla 2 se mencionan en forma resumida las ventajas y desventajas de los biocatalizadores.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la catálisis ácida, básica y enzimática

Tipo de catálisis	Ventajas	Desventajas
Ácida	<ul style="list-style-type: none"> I. Sin formación de jabones II. Realiza el proceso de esterificación y transesterificación III. Empleo de aceites con alto contenido de AGL 	<ul style="list-style-type: none"> I. Largos tiempos de reacción II. Corrosión de equipos III. Mayor generación de residuos para neutralización IV. Reciclaje de catalizadores problemático V. Mayor temperatura de reacción VI. Actividad catalítica débil VII. Mayor costo debido a que se requieren de mayores concentraciones de catalizador
Básica	<ul style="list-style-type: none"> I. Bajo costo II. Cinética favorable III. Alta actividad catalítica, 400 veces mayor que los catalizadores ácidos III. Condiciones de reacción leve y con baja energía IV. Uso de temperatura y presión moderadas V. Menor tiempo de reacción VI. Generación de glicerina como subproducto 	<ul style="list-style-type: none"> I. Saponificación si el contenido de AGL es mayor a 3% II. Formación de emulsiones III. No reutilizable IV. Generación de aguas residuales para su purificación V. Condiciones anhidras
Enzimática	<ul style="list-style-type: none"> I. Catalizador reutilizable II. No genera residuos III. Selectividad 	<ul style="list-style-type: none"> I. Tiempos prolongados de reacción II. Costo excesivo de proceso

Fuente: Tariq *et al.*, 2012 y Leung *et al.*, 2010

1.6 Parámetros de calidad del biodiésel

De acuerdo con la materia prima empleada y el proceso de producción, la composición del biodiésel cambia, es por ello que una vez que se produce, se lleva a cabo una caracterización, donde se distinguen parámetros específicos que definen la calidad del biodiesel para su empleo y comercialización. A continuación se exponen las propiedades que influyen en la calidad del biodiesel.

- **Densidad.** La densidad afecta a la combustión, debido que la inyección del combustible al motor se realiza en volumen y no en masa de acuerdo con la capacidad total del inyector. Si se toma en cuenta que el contenido energético del combustible es proporcional a la masa inyectada, y que ésta a su vez depende de la densidad del combustible, entonces dicho valor de densidad afectara la inyección y por consiguiente la eficiencia del motor. Asimismo, la densidad se relaciona con la cantidad de esteres grasos poliinsaturados contenidos en el biodiésel, puesto que ésta aumenta al elevarse el contenido de insaturaciones (Knothe y Razon, 2017).
- **Índice de acidez.** El índice de acidez del aceite y biodiésel es la masa en miligramos de KOH requerida para neutralizar 1 g de muestra. En el aceite el valor de acidez debe ser <3% de AGL para evitar la formación de jabones. El valor de acidez después de la transesterificación es importante ya que una mayor cantidad de AGL puede causar corrosión y la obstrucción en la bomba por la generación de depósitos, lo que disminuye la vida útil del motor (Tariq *et al.*, 2012).
- **Índice de Yodo.** Dado que la oxidación de los lípidos se inicia en los sitios de insaturación, es crucial conocer el índice de yodo ya que este nos indica la cantidad de insaturaciones presentes (Knothe y Razon, 2017). A mayor grado de ácidos grasos poliinsaturados la oxidación será más frecuente, por lo que la calidad del biodiésel se verá disminuida.

- **Calor de combustión.** Este es la energía térmica liberada durante la combustión es decir, el contenido de energía. En las mezclas de diésel /biodiésel, a medida que las proporciones del biodiésel incrementan de 0% a 100% sobre las del diésel, el contenido energético disminuye (Moser, 2009). Lo anterior debido a que la combustión del biodiésel es 12% menor que la energía obtenida por la combustión del diésel convencional (Tüccar *et al.*, 2014).
- **Viscosidad cinemática.** La viscosidad es un factor que afecta la atomización de un combustible tras la inyección en la cámara de combustión. Una viscosidad alta produce una pobre atomización, lo cual propicia la formación de depósitos en el motor, acortando su período de uso. Por lo anterior, el valor de viscosidad del biodiésel deberá ser de un orden de magnitud menor que la del aceite de partida.

La viscosidad se ve afectada por factores estructurales, ya que ésta aumenta con la longitud de cadena, (número de átomos de carbono) y con su grado de saturación, asimismo, la viscosidad también cambia con el número y tipo de los enlaces dobles presentes, una mayor proporción de enlaces dobles cis presentan una viscosidad más baja, en comparación con la configuración trans (Knothe y Razon, 2017).

- **Numero de cetano (NC).** Éste es un indicador de la calidad del biodiésel, ya que nos muestra la velocidad de ignición es decir, el tiempo que transcurre entre la inyección del combustible al cilindro y el inicio de la ignición. A mayor índice de cetano el tiempo de encendido será más corto, lo que generalmente es considerado óptimo para el funcionamiento de un motor (Knothe y Razon, 2017).

- **Estabilidad oxidativa.** La estabilidad oxidativa es de gran importancia ya que ésta afecta al biodiésel en los períodos de almacenamiento prolongado. La autoxidación, se presenta debido a la extracción de hidrógeno por la presencia de aire, luz, calor, trazas de metales, peróxidos y de la naturaleza del contenedor en el que se encuentran. Los radicales libres reaccionan exotérmicamente con oxígeno molecular produciendo peróxidos, que posteriormente reaccionan con lípidos no oxidados produciendo más radicales libres. Ya que la mayoría de los aceites vegetales de los cuales se produce el biodiésel contienen altas cantidades de esteres de ácidos oleico, linoleico, y linolénico la estabilidad oxidativa resulta un problema latente en el producto final (Moser, 2009).

A pesar de que México sigue a la espera de normas que regulen la producción y utilización del biodiésel, dicha situación se ve controlada actualmente con el apoyo de la Norma EN 14214 de la European Standards, Norma ASTM D6751 de la American Society for Testing Materials y la Norma D7467 de la American Society for Testing Materials.

1.7 Toronja (*Citrus paradisi*)

Los cítricos son frutos tropicales pertenecientes a la familia de las Rutáceas donde se incluyen *Citrus paradisi* (toronja), *Citrus reticulata* (mandarina dulce), *Citrus sinensis* (naranja dulce), *Citrus limón* (limones), entre otras. Éstos son fuente de Vitamina C (ácido ascórbico), y ácido fólico, además contienen fibra. Aunque el objetivo principal de los cítricos es la de producir jugos, los residuos (domésticos e industriales) generados tras su utilización, tales como las cáscara, semillas y pulpas son fuente potencial de subproductos (Rashid *et al.*, 2013). Los cítricos son un fruto distintivo cuyas partes internas están divididas en segmentos, el número de especies existentes no es definido debido a las especies nombradas híbridas (Uysal *et al.*, 2011).

En los últimos años la toronja (*Citrus paradisi*) (Fig.4), ha atraído la atención debido a sus propiedades nutricionales y antioxidantes, además, los cítricos son conocidos por tener compuestos con actividades antivirales, anticancerosas, antiinflamatorias, antialérgicas y analgésicas, entre otras. La toronja es una fuente de ácidos orgánicos, azúcar y compuestos fenólicos, su naturaleza y concentración afectan en gran medida las características gustativas y la calidad sensorial (Uysal *et al.*, 2011). Particularmente las semillas son una rica fuente de flavonoides, vitamina C, tocoferoles, limonoides, esteroides y ácidos grasos (Alessandro *et al.*, 2015).



Clasificación botánica de la toronja

Reino: Vegetal
 División: Magnoliophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Subclase: Rosidae
 Orden: Sapindales
 Familia: Rutaceae
 Género: Citrus
 Especie: *Citrus paradisi*

Figura 4. Toronja (*Citrus paradisi*)

La toronja proviene del toronjo un árbol de clima tropical perennifolio¹ que alcanza de 5 a 8 metros de altura, con la copa redondeada, el follaje poco denso y el tronco ancho. Las ramas jóvenes presentan espinas cortas y flexibles, las hojas son ovaladas y finamente dentadas de entre 7 y 15 cm de largo, presentando una coloración verde oscuro. El toronjo produce flores hermafroditas, blancas o purpúreas, formando racimos terminales de tamaños pequeños (Cruz, 2007).

El fruto del árbol “la toronja”, es un hesperidio globoso o periforme, de hasta 15 cm de diámetro, recubierto de una cáscara (epicarpio) gruesa rugosa o lisa, el interior es color verde, amarillo, naranja o rosáceo, con glándulas oleosas pequeñas y muy aromáticas. La pulpa (endocarpio) es la parte comestible, presenta tonalidades blancas, amarillos o rojas y contiene alrededor de 11 a 14 carpelos (gajos) que contienen el jugo, estos pueden ser dulces o ácidos según la variedad de toronja. Los carpelos están separados por paredes membranosas de sabor amargo. Las semillas son de hasta 1.25 cm de largo, poliembriónicas, lisas, elípticas y de un color que va de amarillo tenue a blanquesino (Cruz, 2007).

1.7.1 Composición de la toronja (*Citrus paradisi*)

Según estudios realizados a Cítricos como *C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. paradisi* muestran que el ácido palmítico, oleico, y linoleico son los principales ácidos grasos presentes en el aceite extraído de las semillas de dichos cítricos, seguidos en cantidades menores por el ácido esteárico y linolénico, aunque también se ha reportado la presencia de ácido laurico, mirístico y palmitoleico entre otros, usualmente en cantidades menores al 1%. Las proporciones de ácidos grasos en los aceites de semillas cítricas son similares a las encontradas en los aceites de palma, colza, canola y soya conocidos por ser utilizados para la producción de biodiésel (Rashid *et al.*, 2013). La composición bromatológica de la toronja (*Citrus paradisi*) se describe en el Anexo A, y en Tabla 3 se ilustra la composición de su semilla.

¹ **Perennifolio, perennifolia.** Que conserva su follaje todo el año

Tabla 3. Composición de las semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

Composición	%
Aceite	36.54 ± 0.36
Proteína	3.90 ± 0.15
Fibra	8.50 ± 0.20
Cenizas	5.03 ± 0.15

Fuente: Anwar *et al.*, 2008

1.7.2 Producción de toronja en México

A nivel mundial la producción de cítricos se estima en 105 millones de toneladas métricas (MTM) anuales, en donde Brasil ocupa el primer lugar como productor, seguidos de Estados Unidos y Pakistán. Se conoce que la pulpa cítrica seca contienen en promedio 4.8% de semillas, lo cual significa que anualmente se producen 0.072 MTM de semillas (Rashid *et al.*, 2013), dicha cantidad se muestra atractiva para la producción de biodiésel con aceite extraído de las semillas de cítricos.

Ahora bien, la toronja es el cuarto cítrico de mayor importancia en México y el mundo, después de la naranja, el limón y la mandarina, dada su producción y utilización. Tan solo en México la producción al cierre del año 2015 fue de 424, 315.36 Toneladas, donde los principales estados productores son: Veracruz, Michoacán, Tamaulipas y Nuevo León (SIAP, 2015).

1.8 Ciclopéptidos

Se definen como ciclopéptidos, a los compuestos cíclicos formados con enlaces peptídicos de 2-37 aminoácidos proteicos y no proteicos (Tan y Zhou, 2006). Las principales familias de plantas en las que se han identificado y aislado ciclopéptidos son Annonaceae (Fig. 5). , Caryophyllaceae, Rhamnaceae y Rubiaceae (Zhou y Tan, 2000). En la estructura característica del ciclopéptido se revela su actividad biológica, como anti-tumoral, antiviral, antifúngico, anticancerígena, entre otras (Almaguer, 2014), éstos presentan frente a los aminoácidos lineales ventajas

farmacológicas como mayor estabilidad metabólica, potencia y selectividad (Oyarbide, 2010). En los últimos 50 años se han descubierto cerca de 455 ciclopéptidos de plantas superiores, pertenecientes a 26 familias, 65 géneros y 120 especies (Tan y Zhou, 2006).

Existe una gran cantidad de frutas, plantas, semillas y raíces estudiadas, entre ellas la familia de las Rutáceas, y existe la presencia de ciclopéptidos en la piel de dicha familia en especies como *C.aurantium* y *C. sinensis*, sin embargo, no existen investigaciones sobre la presencia de ciclopéptidos en la toronja (*Citrus paradisi*), aunque no se descarta la posibilidad.

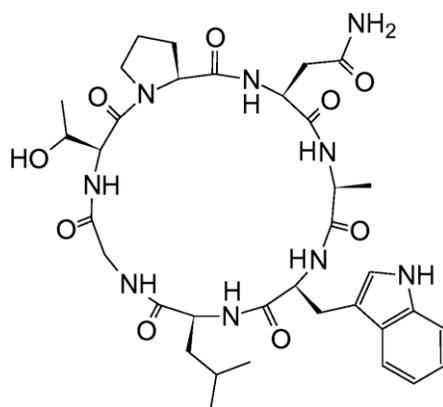


Figura 5. Estructura de Annomuricatin B de *Annona muricata*

La ninhidrina es un reactivo común para detectar aminoácidos, péptidos lineales y proteínas (Zhou, 2000). El método de cromatografía en capa fina con empleo de ninhidrina es además de específico sencillo. En esta reacción la ninhidrina reacciona con los aminoácidos terminales de los péptidos (Wen *et al.*, 2008).

Cuando un aminoácido reacciona con un exceso de ninhidrina se forma amoniaco, aldehído, CO₂ e hidrindantina (ninhidrina reducida). El amoniaco liberado reacciona entonces con la ninhidrina y la hidrindantina, formando un producto de color que va de rosa a violeta (Fig. 6).

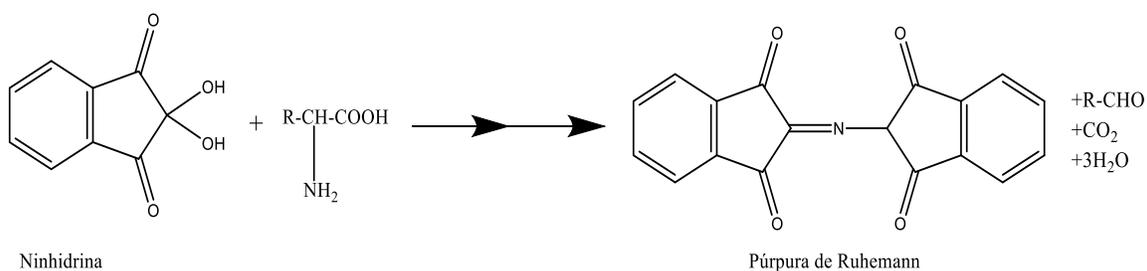


Figura 6. Reacción de Ninhidrina

Para la detección de ciclopéptidos, se recurre a una reacción de Cl₂/*o*-tolidina donde los grupos amino de los ciclopéptidos, en presencia con cloro, forman cloro-aminas, que al reaccionar con la *o*-tolidina, generan un complejo que presenta una coloración azul-violeta (Fig. 7) (Greig y Leaback, 1960), por lo tanto el color azul indica la presencia de ciclopéptidos.

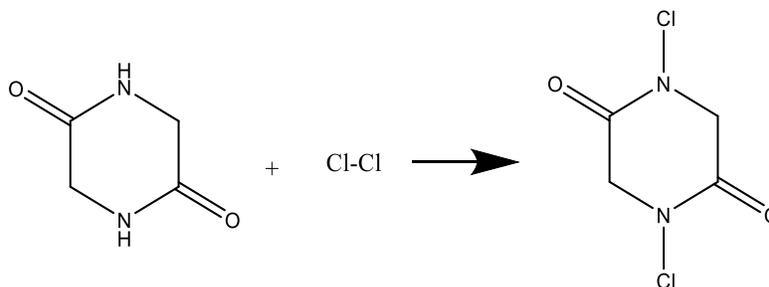


Figura 7. Reacción de *o*-tolidina

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

En el Capítulo II se describen los procedimientos ejecutados en el laboratorio como la caracterización de las semillas de toronja y el aceite extraído de estas, así como los métodos empleados para dicha extracción. Después se detalla el proceso de transesterificación y las pruebas de calidad realizadas al biodiesel obtenido. Finalmente se describe el procedimiento seguido para la detección de los posibles ciclopéptidos.

2.1 Colecta de materia prima

Se partió de un lote de 400 g de semillas que fueron obtenidas en la Central de Abasto de Iztapalapa en la Ciudad de México en el período del 2 al 10 de Febrero de 2016, en bodegas de cítricos y en el contenedor de desechos.

2.2 Selección, limpieza y secado

Las semillas fueron separadas de forma manual de desechos de toronjas en mal estado y de los residuos generados en la obtención del jugo, una vez reunidas se dispuso a separar aquellas que presentaban algún daño físico por insectos, manipulación o indicios de germinación, posterior a esto se lavaron con el propósito de retirar la pulpa rezagada y después de dicha operación fueron colocadas de forma extendida en una charola cubierta con papel estraza que se mantuvo a la sombra durante 15 días, esto para favorecer el secado de las semillas. Trascurrido el tiempo de secado, las semillas fueron pesadas empleando una balanza analítica Oertling.

2.3 Características físicas de las semillas

Se tomó al azar una muestra de 30 semillas de toronja, a las cuales se les midió el largo, ancho y grosor, utilizando para ello un vernier metálico y su masa que fue determinada mediante el empleo de una balanza OHAUS Galaxy 160. Una vez medidas, las semillas fueron guardadas de forma individual. Con los datos obtenidos de dimensión y peso se realizó la estadística correspondiente para determinar media y desviación estándar.

2.3.1 Determinación de humedad

Se midió el porcentaje de humedad de las semillas moliendo una muestra de 5 g en una licuadora convencional marca Oster modelo 6640-13, hasta un tamaño de partícula de 9 mm, de esta muestra se tomó una cantidad de 0.5 g que se colocaron de forma extendida en una termobalanza OHAUS MB35, dicha determinación fue realizada por triplicado a una temperatura de 90° C (NMX-F-428-1982).

2.4 Extracción del aceite de la semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

2.4.1 Método Soxhlet

Las semillas ya secas fueron molidas y posteriormente se elaboraron cartuchos de papel filtro con un contenido de 40 g de semilla cada uno, los cuales fueron sellados con grapas. Dichos cartuchos fueron introducidos a la cámara Soxhlet, la cual se mantuvo en reflujo con hexano como disolvente y agitación magnética durante 18 horas (Fig. 8).



a)



b)

Figura 8. Métodos de extracción del aceite de semillas de toronja a) Soxhlet, b) Maceración

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto hexánico fue retirado del equipo soxhlet y secado con Na_2SO_4 anhidro, el sólido resultante fue separado mediante filtración por gravedad. Después de lo anterior, el extracto hexánico se colocó en un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R-124, para concentrar el aceite obtenido de las semillas (Ajewole y Adeyeye, 1993). Para corroborar que al aceite se encontraba libre de hexano se midió la masa hasta que ésta se mantuvo a peso constante. Al finalizar se determinó el rendimiento de aceite resultante.

2.4.2 Método de maceración

Se pesaron 194.44 g de semilla molida y se colocaron en un matraz bola de 2 L y se le adicionaron 800 mL de hexano como disolvente. Dicho matraz se dejó tres días, trascurrido este tiempo de extracción, el contenido del matraz se filtró para por gravedad para separar el sólido resultante del extracto hexánico. El extracto obtenido se colocó en un evaporador rotatorio marca Büchi modelo 5-124 a 60°C, con el fin de eliminar disolvente. Se efectuaron 3 extracciones, las cuales se reunieron y se determinó el rendimiento una vez que el aceite se encontró libre de disolvente.

Cálculo de rendimiento de aceite

El rendimiento se determinó mediante la relación existente entre el peso del aceite obtenido y la masa de semilla seca empleada, la siguiente ecuación representa dicha relación:

$$\%Rendimiento = \frac{m_{aceite} (g)}{m_{semillas\ de\ Toronja}} \times 100$$

En el diagrama 1, se muestra el procedimiento experimental elaborado para la extracción del aceite esencial de toronja (*Citrus Paradisi*)

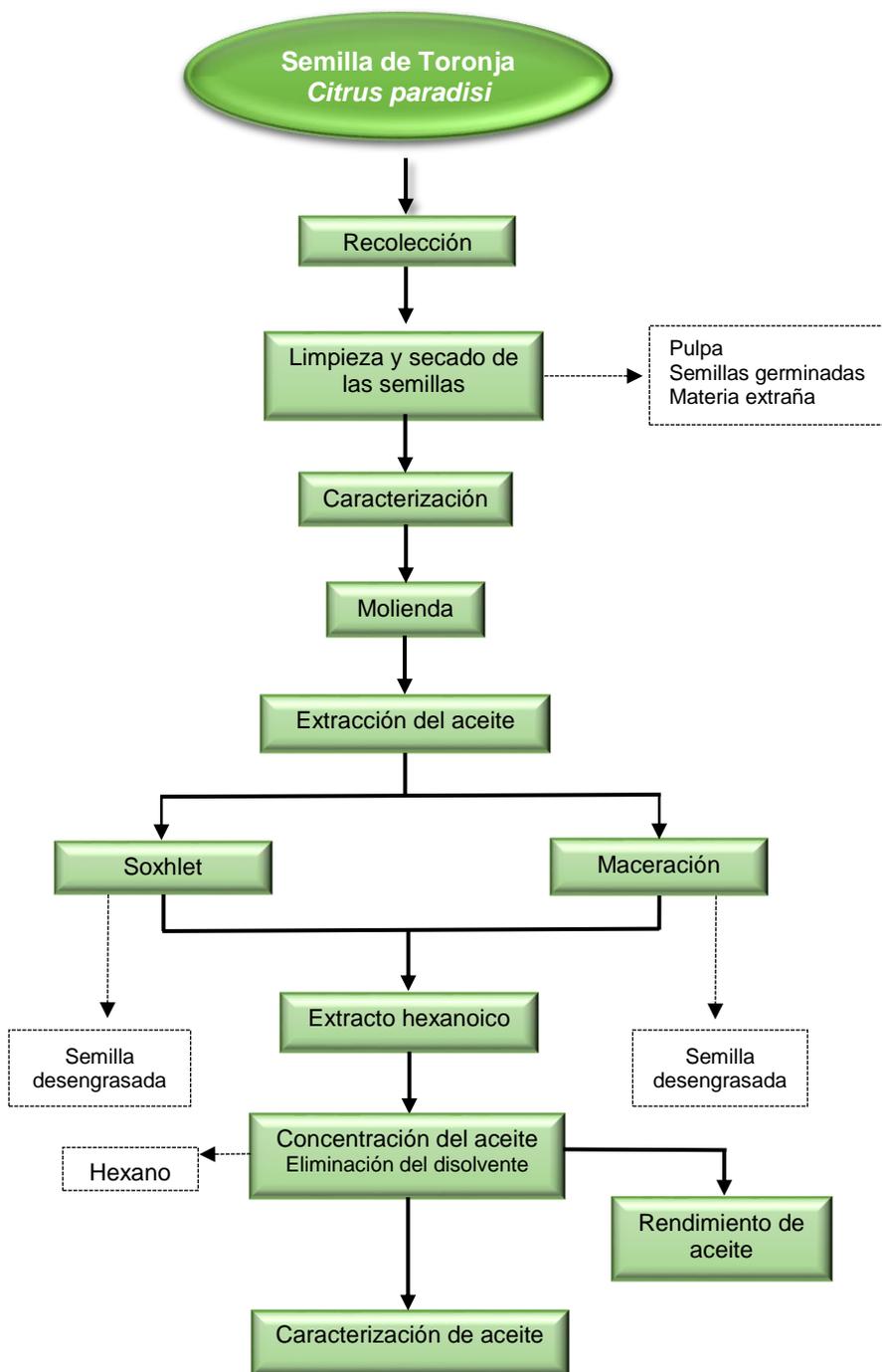


Diagrama 1. Proceso de extracción de aceite de semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

2.5 Reacción de transesterificación

La obtención del biodiésel se efectuó empleando reacción de transesterificación en medio alcalino, para llevarla al cabo, en un matraz bola de dos bocas equipada con un refrigerante, embudo de adición y agitación magnética, se mezclaron 6.6 mL de MeOH y 0.12 g de KOH, que corresponden a una relación 30% metanol y 0.6% KOH respecto al volumen de aceite, éstos se mantuvieron en agitación 30 minutos. Transcurrido este tiempo, al matraz se le adicionaron 20.22 mL de aceite de toronja y se calentó la reacción a una temperatura de 60 °C por 1.5 h (Fig. 9).

Se realizó un monitoreo del avance de reacción cada 30 minutos mediante la técnica de Cromatografía en Capa Delgada empleado placas de silica gel (Silica Gel 60 F₂₅₄) como fase estacionaria. Se empleó el aceite de toronja como la referencia y se comparó con el producto de la reacción; como eluyente se utilizó una mezcla Hexano/AcOEt/AcOH (9:1:0.1) y las cromatoplasas se revelaron en una cámara de yodo.

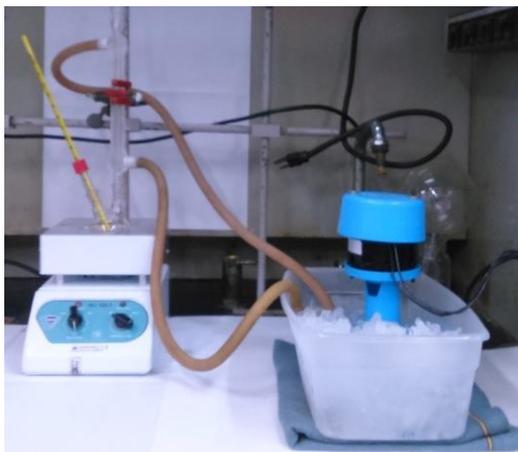


Figura 9. Reacción de transesterificación

Al finalizar la reacción de transesterificación, el producto se trasladó a un embudo de separación de 250 mL, dejándose reposar 24 horas para la separación de fases entre el biodiesel y la glicerina.

Transcurridas las 24 h, la glicerina fue separada y el biodiesel se lavó empleando agua a 70° C, dejándola caer lentamente por las paredes del embudo para continuar agitando éste cuidadosamente para evitar la formación de una emulsión entre el agua y el biodiésel, dichos lavados se realizaron en fracciones de 10 mL de agua cada uno, hasta pH neutro (Tücar et al, 2014; Rashid et al, 2013). El biodiesel lavado fue secado con Na₂SO₄ anhidro y a continuación se centrifugó a 660 rpm durante 20 minutos para separar del sólido resultante. Una vez obtenido el biodiesel, éste se pesó y se determinó su rendimiento.

En la actualidad aún no se permite el uso de biodiésel puro (B100) de forma directa en motores. Por lo anterior, se procedió a encontrar una proporción adecuada de diésel petroquímico y biodiésel de toronja, donde su empleo propicie un funcionamiento óptimo en el motor. Para efectuar esto, se prepararon mezclas en diferentes proporciones de diésel: biodiésel siendo los porcentajes de éste último de B10, B20, B30, B40 y B50.

En el diagrama 2, se muestra el procedimiento experimental empleado para la obtención del biodiésel usando aceite de las semillas de toronja (*Citrus Paradisi*) como materia prima.

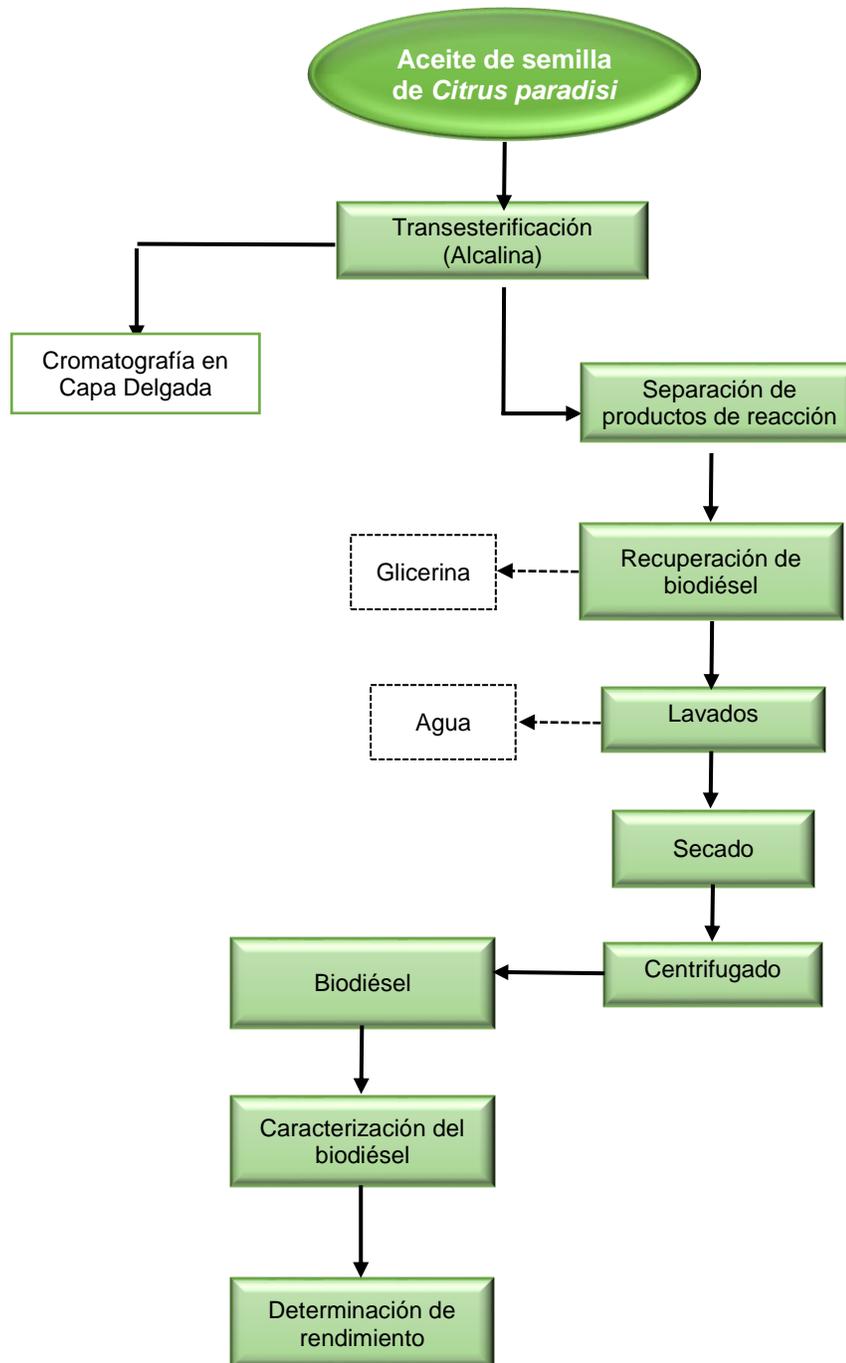


Diagrama 2. Proceso de obtención de biodiésel de aceite de semilla de toronja (*Citrus paradisi*), mediante la reacción de transesterificación

2.6 Pruebas de calidad para la caracterización del aceite y el biodiésel

2.6.1 Índice de acidez

Se estimó el índice de acidez empleando una muestra de 1 g que se colocó en un matraz erlenmeyer de 125 mL, al que se le adicionaron 10 ml de metanol, y 3 gotas de fenolftaleína. Una vez realizado lo antes mencionado se mantuvo a 50 °C en agitación magnética y se procedió a titular la mezcla con una solución de KOH 0.00776 N, hasta obtener una coloración rosa tenue (NMX-F-101-SCF1-2012). Se registró el volumen de KOH gastado y se realizó el cálculo de acidez usando la siguiente expresión:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(\text{mL KOH})(\text{N KOH})(56.102 \text{ mg KOH})}{\text{g muestra}}$$

Donde:

mL KOH= Volumen de Hidróxido de potasio gastado por la muestra; N KOH= Normalidad del Hidróxido de potasio empleado en la titulación; 56.102 mg KOH= peso equivalente del Hidróxido de potasio; g muestra= Masa en gramos de la muestra empleada

2.6.2 Índice de Yodo

Para esta determinación se pesaron 0.1 g de muestra en un matraz de 250 mL cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz. Se adicionaron 10 mL de diclorometano y 10 mL de reactivo de Wijs, dejando reposar la mezcla en la obscuridad durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se agregaron 10 mL de solución de KI al 10% y 100 mL de agua destilada. La mezcla se tituló con una solución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.051 N hasta alcanzar un tono amarillo paja, en este punto se adicionó 1 mL de almidón al 10 % y se continuó la titulación hasta hacer desaparecer la coloración azul intenso (NMX-F-152-SCFI-2011). Esta determinación se realizó por triplicado.

Se registró el volumen de solución de Na_2SO_3 empleado y se procedió a realizar el cálculo para determinar el índice de yodo, con el uso de la ecuación que se muestra a continuación:

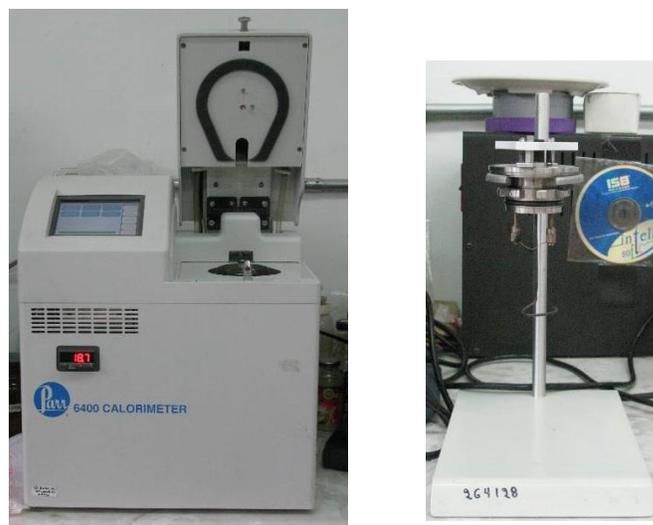
$$IY = \frac{(V_2 - V_1) \times 127 \text{ g } I_2 \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \times 100}{m_{\text{aceite}} \text{ (g)}}$$

Dónde:

V_2 =Volumen de Tiosulfato de Sodio gastado para la muestra; V_1 =Volumen de Tiosulfato de Sodio gastado en el blanco; $N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ = Normalidad de Tiosulfato de Sodio empleado en la titulación; m = Masa en gramos de la muestra empleada

2.6.3 Calor de combustión

Este parámetro se determinó con el uso de un Calorímetro Isoperibólico Automático Parr 6400 (Fig. 10), para ello se pesaron 0.5 g de aceite directamente en el porta muestra del equipo, posterior a esto se vinculó el aceite al alambre de ignición mediante un hilo de ignición, procurado que dicho hilo solo tuviera contacto con la muestra de aceite, después se introdujo el soporte que contenía la muestra a la bomba con precaución de que el aceite no se tirara, finalmente se cerró el equipo y se corrió la muestra.



a)

b)

Figura 10. Calorímetro empleado en la determinación de Calor de combustión
a) Calorímetro Isoperibólico Automático Parr 6400, b) Soporte de la muestra

El equipo mantiene la chaqueta periférica a una temperatura constante, mientras que la temperatura de la bomba y la cubeta si presentan aumentos de temperatura a medida que el calor se libera por la combustión realizada.

2.6.4 Viscosidad

Los valores de viscosidad dinámica y cinemática fueron obtenidos mediante el uso de un viscosímetro Anton Paar Stabinger SVM 3000, donde se introdujo una muestra de 4 mL del aceite a evaluar (diésel petroquímico, biodiésel y mezclas diésel: biodiésel), a las que se les fue cambiando la temperatura de manera gradual desde 20 °C y hasta 90 °C en intervalos de 10 °C (Fig. 11).

La determinación de viscosidad en este equipo se basa en la medición de torque y revolución a través de un imán rotatorio, como se describe a continuación:

El equipo funciona mediante el empleo de un rotor que cuenta con un imán integrado y que flota una vez que la muestra es inyectado al tubo en forma de “U”. Una vez que dicha muestra se encuentra en el equipo, el rotor gira a velocidad constante y se mantiene al centro dadas las fuerzas centrifugas, además de la eliminación de la fricción externa por la presencia del aceite. El aumento de temperatura se realiza con un sistema Peltier que tiene integrado el equipo y por lo que puede cambiar la temperatura con la misma muestra inyectada



Figura 11. Viscosímetro Anton Paar Stabinger SVM 3000

2.6.5 Densidad

La densidad del aceite fue medida por el equipo Anton Para Stabinger Viscosimeter SVM 3000, para esto se emplearon 4 mL de muestra (aceite, biodiésel o diésel) que fueron inyectados en el equipo, y una vez dentro se aumentó la temperatura de 20 °C hasta 90 °C, en intervalos de 10 °C.

2.6.6 Resonancia magnética nuclear ¹H

Se pesaron 0.0500 g de muestra, dicho análisis fue elaborado con el apoyo del Laboratorio de Productos Naturales de la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, haciendo uso de un espectrómetro Agilent 400 con frecuencia de 400 MHz y empleando CDCl₃ deuterado como disolvente.

2.6.7 Perfil de ésteres metílicos por Cromatografía de gases

Ésta determinación se realizó por la técnica de Cromatografía de gases en un equipo Agilent 6890, mediante el método de análisis FAME, y el método de control de ésteres FAME2, empleando además una Columna AT-FAME 30mX0.25mmX0.25 um espesor de película y bajo las siguientes condiciones:

- Horno 180 °C/ 15 min iniciales, 10 °C/min hasta 230 °C/ 3min finales
- Flujo de hidrógeno 1.8 mL/min
- Temperatura del inyector 250 °C
- Temperatura del detector 250 °C
- Tiempo de adquisición 23 min

2.7 Aislamiento y detección de posibles ciclopéptidos

2.7.1 Maceración hidroetanólica

Se colocaron 103.1 g de bagazo desengrasado con hexano en un matraz de bola de 2 L de capacidad, una vez en el matraz se adicionaron 600 mL de etanol, 400 mL de agua y 1 mL de ácido acético. El matraz se selló con la finalidad de evitar la evaporación del disolvente. El contenido de éste matraz se dejó reposar por tres días realizando agitaciones suaves de forma ocasional, esto para asegurar la mayor cantidad de extracción del bagazo.

Pasados los tres días de macerado el contenido del matraz se filtró para separar el bagazo del extracto hidroetanólico, este último se colocó en un matraz de bola y se sometió a evaporación en un Rota-vapor marca Büchi para la recuperación del etanol. Una vez separada la mayor cantidad de etanol el contenido del matraz fue colocado en un recipiente extendido, donde se dejó una semana bajo la campana de extracción para la evaporación total del agua.

El extracto libre de disolventes se raspó con una espátula. Dicho procedimiento se realizó por triplicado. Una vez obtenidas las tres partes de extracto se colocaron en el mismo recipiente para determinar el rendimiento.

2.7.2 Detección de péptidos y ciclopéptidos

La determinación en el extracto hidroetanólico se realizó mediante la técnica de Cromatografía en Capa Delgada, donde se utilizaron placas de silica gel (Silica Gel 60 F₂₅₄) como fase estacionaria, y como eluyente se preparó una mezcla de MeOH: CH₂Cl₂:H₂O (7:2:gota).

Para identificar la presencia o ausencia de péptidos y ciclopéptidos se utilizaron como referencias en la cromatoplaça L-valina para la prueba de péptidos y 2,4-piperazindiona para la de ciclopéptidos. Asimismo, fueron empleadas soluciones de Ninhidrina y *Cl*₂/*o*-tolidina como reveladores, donde la muestra del extracto hidroetanólico obtenido de la semillas de toronja fue disuelta en metanol.

2.7.2.1 Prueba de Ninhidrina

Para realizar la prueba de Ninhidrina se preparó una solución pesando 0.1 g de Ninhidrina que se disolvieron en 15 mL de acetona y se colocaron en un aspersor.

La muestra de extracto hidroetanólico se disolvió en metanol y se colocó con el empleo de un capilar en una cromatoplaça, junto con las referencias previamente disueltas en metanol: L-valina usado para péptidos y 2,4-piperazindiona para ciclopéptidos. Después de esto, la placa se introdujo en una cámara de elución que contenía una mezcla de MetOH:CH₂Cl₂:H₂O (7:2:una gota). Una vez que la placa se sacó de la elución y secó, se roció con la solución de Ninhidrina y se colocó sobre una parrilla a 90 °C (Wen et al., 2008). Para que la prueba se considere positiva, se debe apreciar una mancha de color morado en el testigo de L-valina, mientras que para la 2,4-piperazindiona no debe aparecer la mancha mencionada. Lo anterior se debe a que la Ninhidrina solo reacciona con los grupos amino y los α -aminoácidos terminales y residuales de la cadena peptídica, el ciclopéptido (2,4-piperazindiona) no contiene estos grupos.

2.7.2.2 Prueba con Cl₂/o-tolidina

Para efectuar la prueba con Cl₂/o-tolidina, se pesaron 0.01 g o-tolidina y se disolvieron en una solución que contenía 15 mL agua, 3 gotas de ácido acético y 0.065 g de KI. Una vez preparado el revelador, se colocó en un aspersor de vidrio.

La muestra de extracto hidroetanólico de la semilla de toronja se disolvió en metanol y se aplicó en una cromatoplaça empleando un capilar, también se aplicaron las sustancias de referencias L-valina y 2,4-piperazindiona. La cromatoplaça se colocó en una cámara que contenía una mezcla de MetOH: CH₂Cl₂: H₂O (7:2: una gota) como eluyente. Posteriormente, la cromatoplaça fue llevada a una cámara de cloro, donde se dejó por 90 min; una vez transcurrido este tiempo, la placa se dejó bajo la campana para la evaporación del cloro durante 24 horas, después de dicho tiempo la placa se roció con el revelador de o-tolidina antes preparado (Smith, 1957). Para considerar esta prueba positiva para ciclopéptidos, la placa debía mostrar una coloración azul para la 2,4-piperazindiona y ningún rasgo de color para la L-valina.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y ANÁLISIS

*En el Capítulo III se exponen los resultados obtenidos en la caracterización del aceite de toronja (*Citrus paradisi*) para comprobar su empleo en la producción de biodiésel, además de realizar una comparación con la norma EN14214 y garantizar la calidad del biocombustible obtenido. Asimismo se identifica la presencia ciclopétidos en el bagazo de semillas de toronja (*Citrus paradisi*).*

3.1 Caracterización física de las semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

Las semillas de toronja (*Citrus paradisi*) presentan una forma elíptica alargada, con terminación en punta, recién separadas son brillantes y amarillas, pero una vez que se encuentran secas tienen una textura áspera y opaca con una tonalidad que va de amarillo tenue hasta blanquecina (Fig. 12).



Figura 12. Aspecto de las semillas de toronja (*Citrus paradisi*) seca

Una vez medida y pesada cada una de las 30 semillas, se realizó la estadística correspondiente para determinar el promedio y desviación estándar de los valores de dimensión y masa, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Dimensiones y masa de las semillas de Toronja (*Citrus paradisi*)

Dimensión	Valor
Largo (cm)	1.25±0.03
Ancho (cm)	0.89±0.06
Grosor (cm)	0.61±0.07
Masa(g)	0.1836±0.0277

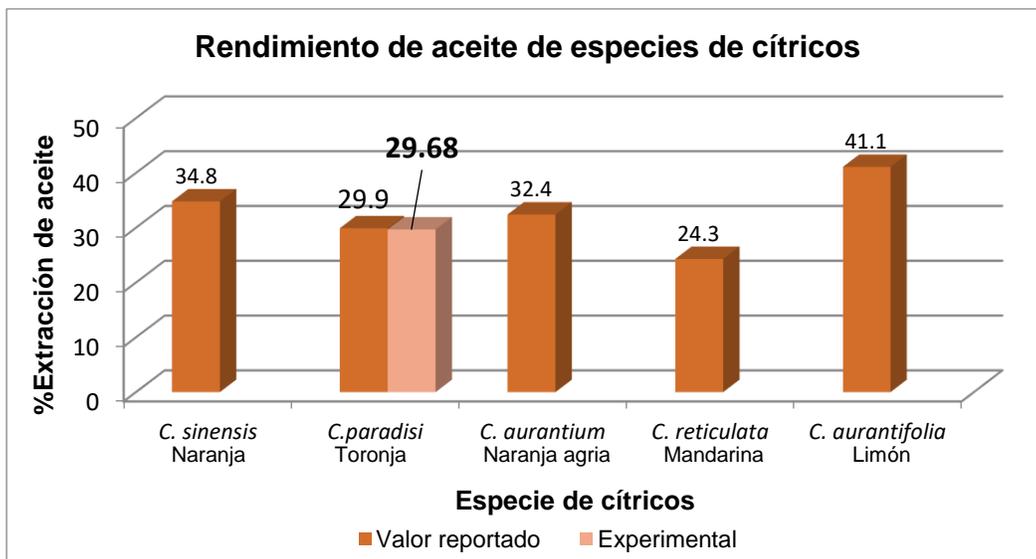
*Los valores reportados representan el promedio de las 30 semillas muestra

3.1.1 Determinación de humedad

Por otra parte se determinó la humedad de la semilla una vez que ésta se encontraba seca, dicha medición se realizó por triplicado en una termobalanza OHAUS MB35 a 90 °C, dando como resultado un valor de 4.63±0.27% de humedad para la semilla de toronja (*Citrus paradisi*) como promedio de las tres mediciones realizadas.

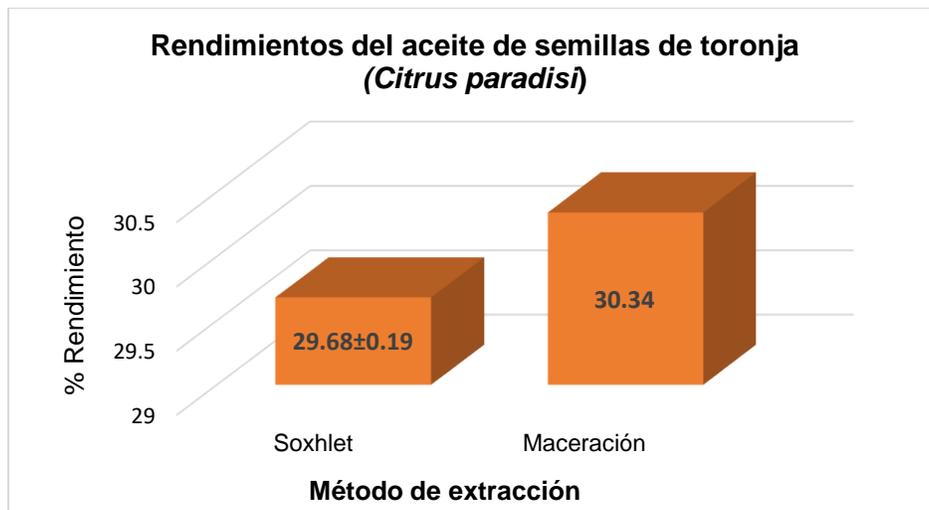
3.2 Obtención del aceite de la semillas de toronja (*Citrus paradisi*), mediante el empleo de los métodos Soxhlet y maceración

Se emplearon dos métodos de extracción (soxhlet y maceración) para la obtención de aceite de semillas de toronja. Para la extracción por Soxhlet se obtuvo un rendimiento de 29.68% de aceite, dicho porcentaje resulta similar al obtenido en el estudio elaborado con semillas de toronja Nigerianas (Ajenwole y Adeyeye en 1993), en donde se reportó un $29 \pm 0.29\%$ de rendimiento de aceite. En el mismo estudio también fueron reportados los porcentajes de aceite obtenidos de las semillas de otras especies cítricas, en la Gráfica 6 se presentan dichos valores para las especies naranja (*C. sinensis*), naranja agria (*C. aurantium*), mandarina (*Citrus reticulata*) y lima (*C. aurantifolia*). Al comparar el rendimiento de aceite de las semillas de toronja con los obtenidos de otros cítricos, se observa que ésta tiene una cantidad de aceite menor en comparación con las otras especies cítricas estudiadas.



Gráfica 6. Comparación de rendimientos de aceite de semilla obtenidos por la extracción de Soxhlet entre distintas especies de cítricos

Por otro lado, al contrastar el rendimiento de aceite de semillas de toronja (*Citrus paradisi*) obtenido mediante Soxhlet con el método de maceración, se puede observar en la Gráfica 7 que el empleo de este último método proporcionó un mayor rendimiento, aunque continua siendo el menor rendimiento respecto a las otras especies cítricas reportadas.



Gráfica 7. Comparación entre rendimientos de aceite de semilla de toronja (métodos de extracción soxhlet y maceración)

Retomando la gráfica 7 y viendo que la diferencia en la cantidad de aceite extraído por los dos métodos no es tan distante, es necesario tomar en cuenta además del valor de rendimiento, otros aspectos para la selección de la extracción tales como la temperatura del proceso, el tiempo de extracción y el tamaño de partícula.

El método de maceración no solo denota un ligero mayor rendimiento, sino un nulo calentamiento, ya que se trata de un proceso estático a temperatura ambiente, pese a que requiere de mayor tiempo de extracción es un proceso sencillo. Asimismo, contrario al método de Soxhlet, no requiere de instrumentación sofisticada, y la cantidad de semilla que se puede manejar es mayor. Por otra parte, a pesar de las grandes cantidades de disolvente que el método de maceración requiere, dicho disolvente puede ser recuperado y reutilizado. Otro factor importante en la extracción de aceite es el tamaño de partícula, puesto que si éste es grande, el área de contacto con el disolvente será menor, y por lo tanto la extracción será ineficiente. Una vez analizadas las condiciones de extracción y realizar la comparación, se entiende que el método de maceración es más viable para la extracción de aceite de semillas de toronja (*Citrus paradisi*).

3.3. Caracterización del aceite de las semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

La principal característica a considerar del aceite de las semillas de toronja es que éste no es comestible ya que proviene de las semillas, que en México son consideradas residuo, esto a pesar de saber que las semillas contienen compuestos con actividades antivirales, antiinflamatorias, bactericidas entre otras. Aunado a esto y con el fin de caracterizar y verificar su empleo en la reacción de transesterificación básica, se realizaron algunas pruebas tales como: índice de acidez, índice de yodo, densidad, viscosidad (cinemática y dinámica) y calor de combustión, los resultados de éstas determinaciones se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Pruebas de calidad para el aceite de semillas de toronja (*Citrus paradisi*)

Prueba	Aceite extraído Citrus paradisi Soxhlet	Aceite extraído Citrus paradisi Maceración
*Índice de acidez mg KOH/g muestra	1.70±0.13	0.52±0.02
*Índice de Yodo g I ₂ /g muestra	100.49±0.39	94.27±0.26
Densidad relativa 20°C	0.9367	0.9180
Viscosidad mm ² /s a 40°C	62.501	34.408
Entalpía de combustión kJ/g muestra	37.99	39.38

*Pruebas realizadas por triplicado

° *Índice de acidez.* El índice de acidez indica la cantidad de ácidos grasos libres que presenta un aceite, por lo tanto la función de realizar esta prueba es la de conocer la aptitud de un aceite para someterlo a transesterificación básica, ya que a mayor valor de índice de acidez existe una mayor cantidad de ácidos grasos libres y por lo tanto las posibilidades de la formación de jabones también incrementan, causando una disminución en el rendimiento de biodiésel.

En la tabla 5 se muestra el índice de acidez del aceite obtenido por ambos métodos, dichos valores se encuentran debajo del 3% de ácidos grasos libres límites para realizar la transesterificación sin la necesidad de efectuar un pretratamiento al aceite (Helwani *et al.*, 2009). Éste valor se indica así ya que si es excedido del 3% de ácidos grasos libres, éstos reaccionarán con el catalizador básico formando jabones, bajando el rendimiento de la reacción y haciendo más difícil la separación del glicerol (Tariq *et al.*, 2012).

Los resultados del índice de acidez para el aceite extraído por el método de soxhlet y maceración son de 1.70 ± 0.13 y 0.52 ± 0.02 mg KOH/g muestra respectivamente, con lo cual se puede inferir que las condiciones del método empleado tales como tiempo y temperatura modificaron el valor de la acidez es decir, que el empleo de temperatura en soxhlet pudo causar que el índice de acidez aumentara. A pesar de las diferencias de acidez, ambos aceites pueden ser empleados en la transesterificación básica. Por otro lado, en un estudio realizado en el Departamento de Química de la Universidad de Agricultura en Pakistán en donde se caracterizaron diversas especies de cítricos, el valor reportado para la acidez del aceite de las semilla de toronja es de 0.66 ± 0.03 mg KOH/g muestra, valor similar al del índice de acidez del aceite extraído por maceración (Anwar *et al.*, 2008).

° *Índice de Yodo*. En un estudio realizado al aceite extraído de semillas de toronja Pakistaníes el índice de yodo se reporta como 101.50 ± 2.5 I₂/g muestra (Anwar *et al.*, 2008), mientras que los obtenidos en éste estudio son de 100.4 ± 0.39 g I₂/g muestra para el aceite extraído por soxhlet y el obtenido en el aceite extraído por maceración es 94.27 ± 0.62 g I₂/g muestra, como dichos valores se observa que el aceite obtenido mediante soxhlet tiene mayor índice de yodo en comparación con el obtenido por maceración.

Dado que esta prueba otorga una medida de la cantidad de instauraciones que se encuentran en el aceite, un valor alto en esta prueba revelaría que el aceite es propenso a sufrir oxidación y por ende tendrá un período de utilidad menor debido a la degradación por la temperatura o la luz. Es importante rescatar que a mayor número de instauraciones, el aceite también presenta un punto de congelación

menor, lo que indica que el biodiesel que se puede producir podría ser empleado en climas fríos (Knothe y Razon, 2017).

Asimismo, si se contemplan los valores de índice de yodo de las materias primas empleadas comúnmente en la obtención de biodiesel expuestos en la Tabla 6, se observa que estos se mantienen por arriba de 80 y debajo de 150 g I₂/g muestra, por lo que índice de yodo para el aceite de semillas toronja por ambos métodos se encuentran dentro de este intervalo.

Tabla 6. Índice de Yodo de aceites empleados en la obtención de biodiésel

Materia prima	Índice de Yodo (g I₂/g muestra)	Referencia
Palma	97	Singh and Padhi, 2009
Higuerilla	84.4	Demirbas <i>et al.</i> , 2016
Soja	117-143	Demirbas <i>et al.</i> , 2016
Jatropha	101	Reyes <i>et al.</i> , 2014
Colza o canola	94-120	Demirbas <i>et al.</i> , 2016
*Toronja (semillas)	100.49±0.39 (soxhlet) 94.27±0.26 (maceración)	Este trabajo

*Resultados experimentales de este trabajo

° *Densidad.* En comparación con la densidad del diésel petroquímico cuyo valor es de 0.8348 g/ml a 20° C, la densidad del aceite de semillas de toronja obtenido por los dos métodos es mayor, siendo el valor más alto de densidad el del aceite extraído por el método de soxhlet (0.9367 g/ml a 20° C) en comparación al obtenido por maceración (0.9180 g/ml a 20° C).

Por otra parte, si se compara el valor de la densidad del aceite de toronja con el de otras especies usadas para la obtención de biodiésel como la jatropha, palma y soja, se puede notar que éstos oscilan entre los obtenidos para aceite de semillas de toronja (Reyes *et al.*, 2014 y Fukuda *et al.*, 2001).

° *Viscosidad.* Por otro lado la viscosidad como se mencionó anteriormente afecta directamente el funcionamiento del motor, ya que si esta es alta la atomización del combustible es pobre y por tanto la posibilidad de sedimentos es mayor, lo cual disminuye el rendimiento y vida útil de éste. Se ha reportado que las viscosidades de los aceites vegetales son de 10 a 20 veces más altas que la que presenta el diésel petroquímico (Demirbas *et al.*, 2016), por tal motivo el uso de aceites vegetales de forma directa en los motores no es recomendable.

En el caso del aceite de semillas se toronja, los valores de viscosidad son de 62.501 mm²/s a 40°C para el aceite extraído mediante Soxhlet y de 49.721 mm²/s a 40°C para maceración, mientras que para el diésel petroquímico es de 2.6235 mm²/s a 40°C, este último valor es congruente con el reportado por Singh y Padhi, 2009 de 2.60 mm²/s a 40°C. Lo anterior indica que la viscosidad del aceite de semillas de toronja es mucho mayor al del diésel fósil, se espera que la reacción de transesterificación pueda reducir el valor de viscosidad del aceite de toronja.

° *Calor de combustión.* El calor de combustión por su parte, asume un papel muy importante en la producción de biodiésel, ya que indica la energía contenida en un gramo de aceite al efectuarse el proceso de combustión.

En la Tabla 7 se presentan los calores de combustión obtenidos para el aceite de toronja mediante soxhlet y maceración (37.99 y 39.38 KJ/g muestra respectivamente), éstos valores son inferiores al del diésel convencional (46.03 KJ/g muestra). Es posible observar también en la misma tabla que los calores de combustión reportados para materias primas comúnmente usadas para la obtención de biodiesel, son similares a los obtenidos para el aceite de semilla de toronja.

Tabla 7. Calor de combustión de aceites de distintas especies usadas comúnmente en la producción de biodiésel

Materia prima	Calor de combustión (KJ/g muestra)	Referencia
Palma	39.8	Selvaraj et al., 2016
Soja	39.6	Reyes <i>et al.</i> , 2014
Jatropha	33	Singh y Padhi, 2009
Colza o canola	39.7	Vera, 2014
*Toronja (semillas)	37.99 (soxhlet) 39.38 (maceración)	Este trabajo

**Resultados experimentales de este trabajo*

Con base en los resultados obtenidos de los parámetros de calidad del aceite de semillas de toronja (extracción soxhlet y maceración), se puede declarar que éste es adecuado para ser sometido a una reacción de transesterificación básica y con ello producir biodiésel.

3.4 Obtención de biodiésel por transesterificación en medio básico

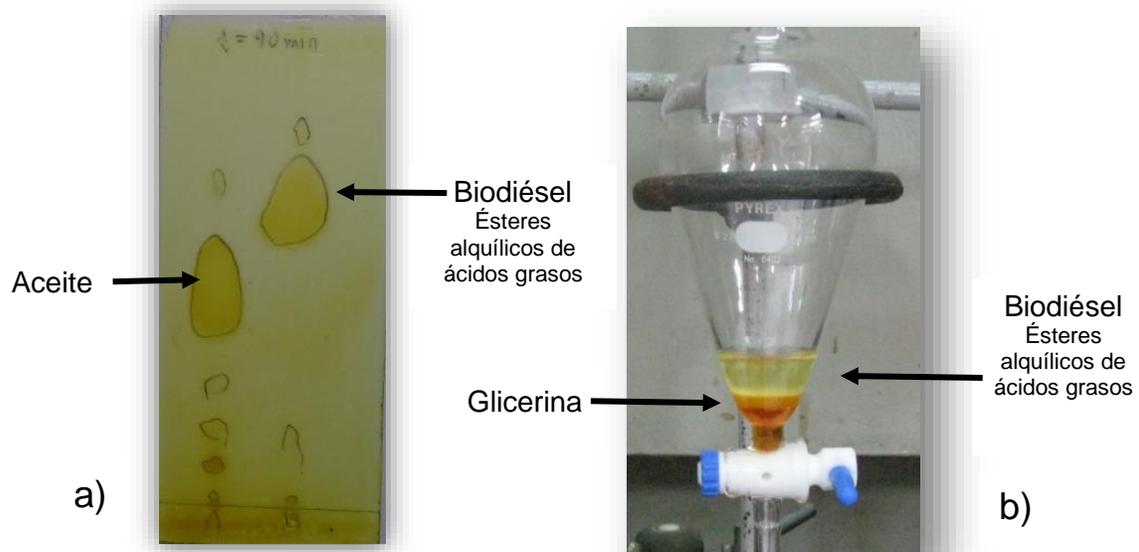
Una vez obtenidas las características fisicoquímicas del aceite de semillas de toronja, se evidencio el potencial que éste tiene para ser sometido a una transesterificación básica, puesto que el índice de acidez es menor a 3% y el valor en el índice de yodo y calor de combustión es similar al de otras especies usadas en la producción de biodiésel.

Como se ha mencionado, la catálisis básica ofrece los mayores rendimientos (>90%) en la conversión de aceites y grasas a biodiésel. Investigaciones realizadas sostienen que los valores óptimos para incrementar el rendimiento de la transesterificación son: temperatura de 60 °C, <1% de catalizador (basado en la cantidad de aceite empleada), y proporciones 3:1 alcohol/triglicéridos durante 45 minutos (Selvaraj *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha propuesto que las proporciones de optimización corresponden a una relación de 6:1 alcohol/ triglicéridos, 1% de catalizador respecto a la cantidad de aceite empleado, temperatura de 60° C y un tiempo de reacción de 60 minutos (Bankovic *et al.*, 2014). Se ha sugerido que también la reacción puede alcanzar rendimientos de hasta 90.6% con el uso de 30% v/v de metanol respecto al aceite empleado (Verma y Sharma, 2016). En otro estudio, las proporciones usadas corresponden a una relación molar 12:1 alcohol/trigliceridos, con un 0.6% de KOH como catalizador, con base en la cantidad de aceite empleado (Felizardo *et al.*, 2003), manteniendo la reacción en un intervalo de temperatura de 55-60°C durante 90 minutos con reflujo y agitación constante, esto con el fin de asegurar la conversión completa de triglicéridos a esteres metílicos y por lo tanto conseguir mayor rendimiento.

Es importante mencionar que otro factor determinante en la reacción es el tiempo, puesto que si este es muy corto, la reacción podría no estar completa además de que el producto podría contaminarse con los residuos de aceite que no reaccionó. Por el contrario, un exceso de tiempo de reacción propiciaría la hidrólisis de ésteres o la reversibilidad parcial de la reacción, el rendimiento en la transesterificación básica alcanza su máximo en un tiempo menor o igual a 90 minutos (Leung *et al.*, 2010).

El avance de reacción se monitoreo mediante Cromatografía en Capa Delgada, donde se empleó como eluyente Hexano/AcOEt/AcOH (9:1:0.1), posteriormente las placas se revelaron con Yodo. Este análisis se efectuó cada 30 minutos, una vez que la temperatura de la reacción alcanzara los 60°C. La reacción se consideró finalizada hasta que en la cromatoplaaca se apreciaba una nueva marca arriba de la la marca señalada como aceite, esto se pudo visualizar a los 90 minutos de reacción. El biodiésel tiene un mayor desplazamiento en la placa debido a su menor peso molecular en comparación con el aceite (Fig, 13).

Asimismo, la transesterificación debe llevarse a cabo en condiciones anhidras puesto que la presencia de agua es potencialmente perjudicial para la reacción puesto que podría propiciar la formación de jabones.



*A: Aceite; B: Biodiésel de toronja

Figura 13. Producto de transesterificación. a) Cromatoplaaca a 90 min de reacción de transesterificación del aceite de semillas de toronja (maceración), b) Productos de transesterificación, biodiésel separados por diferencia de densidades (Parte superior biodiésel y glicerina en la inferior)

Pese a que los valores no están reportados, la transesterificación también se llevó a cabo variando el tiempo de reacción en 60 min, 90 min y 120 min, encontrando como óptimo para completar la reacción un tiempo de 90 min.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el producto de la transesterificación se colocó en un embudo y se dejó reposar durante 24 h. En este lapso se separó la glicerina del biodiésel por diferencia de densidades (Fig. 16), posteriormente el biodiésel fue lavado con agua a 70°C en proporciones 1:3 v/v biodiésel:agua, hasta pH neutro. El biodiesel resultante fue secado con sulfato de sodio anhidro y posteriormente, el sólido obtenido fue separado del líquido mediante centrifugación.

Al recuperar el biodiésel se calcularon los rendimientos obtenidos, los cuales están expuestos en la Tabla 8, en donde se puede notar que la transesterificación realizada al aceite de semillas de toronja extraído por el método de maceración cuyo porcentaje es de 81.31% fue mayor comparado con el 79.96% obtenido de la reacción realizada al aceite extraído por soxhlet, los tiempos en los que se alcanzó el termino de reacción fueron de 90 minutos para ambas reacciones.

Tabla 8. Rendimiento de biodiésel respecto al método de extracción de aceite

	Aceite extraído <i>Citrus paradisi</i> Soxhlet	Aceite extraído <i>Citrus paradisi</i> Maceración
Temperatura de reacción	60 °C	60° C
Tiempo de reacción	90 min	90 min
% Rendimiento	79.96%	81.31%

Como puede notarse los rendimientos de biodiésel obtenidos una vez llevada a cabo la transesterificación son muy similares para el aceite obtenido de soxhlet y maceración, aunque dicha diferencia puede ser atribuida a los valores de acidez, ya que a mayor índice de acidez el rendimiento sería más bajo, dada la cantidad de ácidos grasos libres que el aceite contenía.

3.5 Caracterización del biodiésel

Para establecer la calidad del biodiésel producido a partir del aceite de semillas de toronja, se efectuó su caracterización y los resultados se pueden visualizar en la Tabla 9, donde se presentan algunas propiedades determinantes de su calidad (índice de acidez, índice de yodo, densidad, viscosidad y calor de combustión). Los resultados fueron comparados con datos de diésel petroquímico y con los parámetros establecidos por la Norma europea EN 14214/07.

Tabla 9. Resultados de la caracterización del biodiésel de semillas de toronja, diésel petroquímico y norma europea EN 14214/07

Prueba	Biodiésel <i>Citrus paradisi</i> Soxhlet	Biodiésel <i>Citrus paradisi</i> Maceración	Diésel petroquímico	Norma europea EN 14214/07
Índice de acidez mg KOH/g muestra	0.47 ±0.06	0.4±0.04	-	0.5 máx.
Índice de Yodo g I ₂ /g muestra	91.69±0.91	88.14±0.47	-	120 máx.
Densidad relativa 20°C	0.9080	0.8797	0.8167	0.860-0.900 15° C
Viscosidad mm ² /s a 40°C	12.645	4.2634	2.1813	3.5-5
Entalpía de combustión kJ/g muestra	38.69	41.29	46.03	39.99±0.18

*Pruebas realizadas por triplicado

- Índice de acidez

Expuestos en la Tabla 9 se encuentran los valores del índice de acidez del biodiesel obtenido del aceite de toronja (extracciones soxhlet y maceración), ambos valores no exceden el permitido por la EN 14214/07 siendo de 0.47±0.06 y 0.4±0.04 mg KOH/g muestra para el biodiésel obtenido del aceite extraído por soxhlet y maceración respectivamente, por lo tanto, cumplen con dicha especificación. Es de suma importancia que la acidez no sea alta, puesto que entre más alto sea el valor, indica mayor envejecimiento del biodiésel, causando depósitos y propiciando la corrosión del motor (Tariq *et al.*, 2012).

- Índice de Yodo

Por otra parte el índice de yodo indica la cantidad de insaturaciones presentes en la muestra, el valor de esta prueba para el biodiésel obtenido del aceite de toronja de ambos métodos de extracción, resultó de 91.69 ± 0.91 g I₂/g muestra para el biodiesel del aceite extraído por soxhlet y de 88.14 ± 0.47 g I₂/g muestra para el extraído por maceración, lo que muestra que ambos productos entran en la especificación de la norma EN 14214/07 que indica que el índice de yodo no debe exceder los 120 g I₂/g muestra puesto que un valor mayor revelaría que el biodiésel será más propenso a la oxidación y por tanto a la disminución de su vida útil (Knothe y Razón, 2017). Un valor alto de yodo indica una mayor cantidad insaturaciones, lo que implica la formación de compuestos como aldehídos, ésteres, peróxidos, alcoholes y ácidos grasos de bajo peso molecular, entre otros.

- Densidad

La densidad es otra propiedad importante en el biodiesel, ésta es la masa por unidad de volumen de cualquier líquido a una temperatura dada. Un aumento en la densidad para ésteres metílicos de aceites vegetales aumentaría a su vez la viscosidad. La densidad de aceites es mayor que la del combustible diésel común, esto puede deberse a la presencia de triacilglicérols de mayor peso molecular (Demirbas *et al.*, 2016). La norma EN 14214/07 establece que la densidad relativa debe encontrarse en un intervalo de 0.860-0.900 a 15° C, por lo que con los valores experimentales para el biodiésel obtenidos de los aceites de soxhlet y maceración encontrados en la Tabla 9, se corrobora que se encuentran en el intervalo indicado en la norma (0.9080 a 20°C para soxhlet y 0.8797 a 20°C para maceración). Aunque es importante mencionar que ambos valores de densidad aun son mayores que la densidad relativa del diésel convencional, el cual presenta un valor de 0.8167 a 20°C.

- Viscosidad cinemática

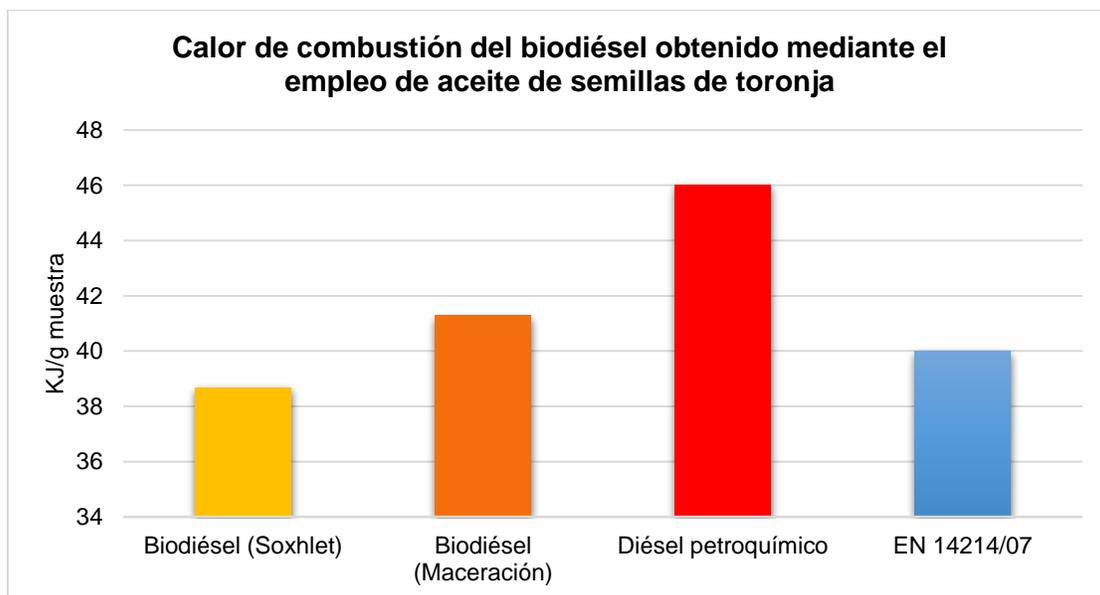
La viscosidad se define como la resistencia de un líquido a fluir, ésta propiedad es la principal razón por la que se utiliza el biodiésel como un combustible alternativo, y es que las altas viscosidades cinemáticas de los aceites vegetales y grasas animales propician problemas en el funcionamiento óptimo del motor cuando estos se emplean de forma directa (Moser, 2009; Knothe y Razón, 2017).

Una vez llevada a cabo la reacción de transesterificación se obtuvieron valores de viscosidad cinemática de 12.645 mm²/s a 40°C para el biodiésel del aceite extraído por soxhlet y de 4.2634 mm²/s a 40° para el biodiésel del aceite de maceración, valores que resultan mayores que el de la viscosidad del diésel convencional de 2.1813 mm²/s a 40°. Ahora bien dado que la norma EN 14214/07 indica que la viscosidad cinemática del biodiésel debe encontrarse en un intervalo de 3.5-5 mm²/s a 40° para ser empleado en un motor, es evidente que mientras el biodiésel del aceite extraído por maceración cumple con lo establecido en la norma, el biodiésel del aceite extraído por soxhlet no se ajusta con la especificación excediéndose por un poco más del doble del valor máximo establecido.

El valor tan alto de viscosidad cinemática del biodiésel de aceite de soxhlet, puede deberse al método de extracción empleado, ya que a pesar de que si existe una disminución evidente entre la viscosidad del aceite y la del biodiésel, la viscosidad del aceite del que se partió era muy alta, por lo que el decremento en dicho parámetro no fue suficiente, por lo antes mencionado respecto a la importancia en esta medida dicho biodiésel resulta complicado y poco viable de emplear.

- Calor de combustión

Ahora bien el valor calórico es la energía liberada tras la combustión del biocombustible donde se obtienen CO_2 y agua. En la Gráfica 8 se presentan los resultados del calor de combustión para el biodiésel de toronja (aceite extraído por soxhlet y maceración), también se presenta el valor del diésel y el de la norma europea EN 14214/07. En la Tabla 9 se puede observar que el calor de combustión más alto corresponde al diésel petroquímico ($46.03 \text{ kJ/g muestra}$), seguido del biodiésel del aceite extraído por maceración ($41.29 \text{ kJ/g muestra}$), mientras que el biodiésel proveniente del aceite extraído por Soxhlet presenta el valor más bajo ($38.69 \text{ kJ/g muestra}$). Si se comparan los valores del biodiésel producido con la norma europea se puede observar que el biocombustible obtenido del aceite extraído por Soxhlet cumple con la especificación de la norma cuyo calor de combustión indicado es de $39.99 \pm 0.18 \text{ kJ/g muestra}$, mientras que el biodiésel de aceite de toronja extraído por maceración, rebasa dicha especificación. Con los resultados de calor de combustión antes mencionados se predice una adecuada eficiencia del motor (Moser, 2009).



Gráfica 8. Calor de combustión del biodiésel, obtenido mediante el empleo de aceite extraído de semillas de toronja por los métodos Soxhlet y maceración

Si se toman en cuenta las pruebas efectuadas al biodiésel de aceite de semillas de toronja (soxhlet y maceración), debido a su alto valor de viscosidad, se descarta el biodiesel generado del aceite extraído por soxhlet por los problemas que podría ocasionar la inyección-atomización en la cámara de combustión de motores.

- Perfil de ésteres metílicos

Tomando en cuenta los parámetros de calidad, se consideró más apto al biodiésel proveniente del aceite de toronja extraído por maceración. Por esta razón, éste biodiesel fue elegido para efectuarle una cromatografía de gases, esto con la finalidad de conocer su perfil de ésteres metílicos. En la Tabla 10 se presenta este perfil y los correspondientes a biodiesel obtenido a partir de otras materias primas como la jojoba, soya, jatropha y palma.

Tabla 10. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos de especies usadas para producción de biodiésel comparados con los obtenidos del biodiésel de toronja

Materia prima	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)	20:0 (%)	Otros (%)
Soya	9.0	5.0	20.0	48.0	5.9	-	12.1
Palma	40.0	3.0	35.0	10	0.3	-	11.7
Jojoba	2.6	-	15.6	-	-	73.0	9.0
Jatropha	20.2	7.2	39.8	31.5	0.3	-	1.0
*Toronja (semillas)	38.2	6.4	28.7	15.6	0.8	-	10.4

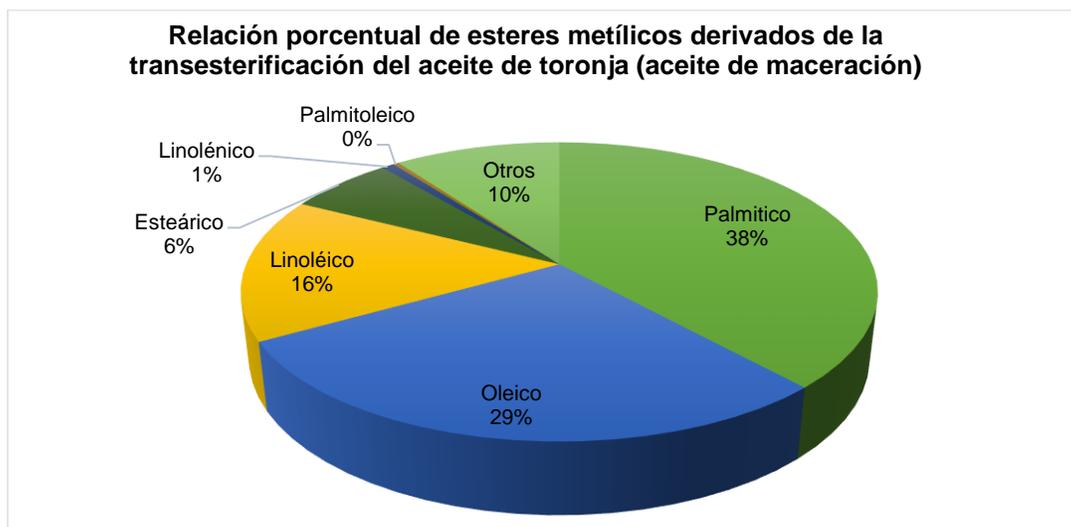
16:0 Palmítico; 18:0 Estearico; 18:1 Oleico; 18:2 Linoleico; 18:3 Linolenico; 20:0 Eicosanoico

*Valores experimentales obtenidos con el aceite de semilla de toronja extraído por maceración

Fuente: Knothe y Razón, 2017; Rashid *et al.*, 2013; Hwa *et al.*, 2014.

Si se observan los perfiles de ésteres metílicos de especies como soya, palma, jatropha y jojoba, se encuentra que los ácidos grasos oleico y linoleico se presentan en mayor porcentaje, a excepción del biodiésel de jojoba en donde se encuentra el ácido eicosanoico en mayor proporción (72.95%). En el caso del biodiésel de semilla de toronja, el ácido palmítico se encuentra en mayor proporción, seguido del oleico y linoleico. En la Gráfica 9 se ilustra que las proporciones de ácidos grasos con más de 4 insaturaciones se encuentran en una proporción mínima.

Dado que el biodiésel obtenido presenta un bajo porcentaje de ésteres metílicos poliinsaturados, puede ser considerado de buena estabilidad, generando pocas deposiciones en la máquina de combustión cuando son calentadas la superficies internas del motor (Reyes *et al.*, 2014).



Gráfica 9. Relación porcentual de esteres metílicos derivados de la transesterificación del aceite de toronja (aceite de maceración)
Elaborada con datos obtenidos de la cromatografía de gases (Anexo D)

- Resonancia Magnética Nuclear

A la par de la cromatografía de gases se elaboró un análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H) tanto para el aceite de las semillas como para el biodiésel (espectros RMN ^1H incluidos en Anexo B y C). Para verificar que la reacción fuera completa, para corroborarlo se observó la desaparición de las señales correspondientes al grupo glicerol del triacilglicerol.

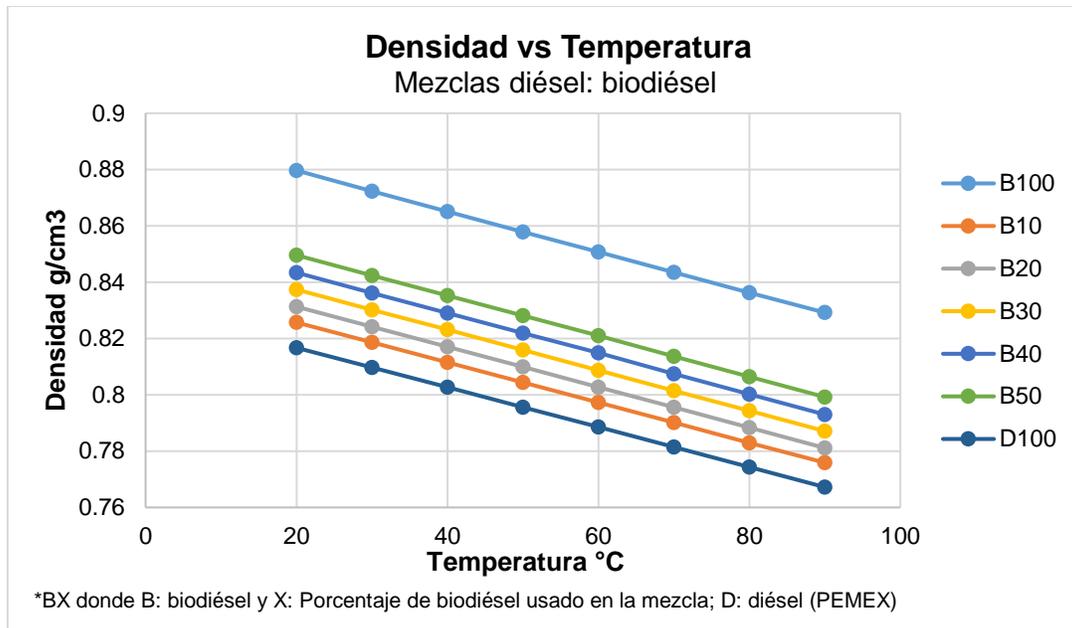
En el espectro de RMN ^1H para el aceite se observaron las señales de 4 a 4.5 correspondientes al Hidrógeno base el triacilglicerol a 5.30 (CH=CH), 2.25 ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-$), 1.25 ($-(\text{CH}_2)_n-$) y 0.85 (CH_3) ppm. Mientras que para el biodiésel la señal del Hidrógeno base el triacilglicerol había desaparecido, por consecuencia de la transesterificación, puesto que se trata de un cítrico el espectro de RMN ^1H del aceite de toronja se comparó con el espectro de mandarina reportado por *Rashid et al.*, 2013, en donde se corroboró la aparición de algunas señales características.

3.6 Mezclas diésel:biodiésel y su comparación con la Norma EN14214/07

El biodiésel se puede utilizar como mezcla con petrodiésel en cualquier proporción porque es completamente miscible en él (Moser, 2009), además de que dicha mezcla hace posible la mejora de las cualidades del biocombustible (Silitonga et al, 2013), por lo tanto se procedió a realizar mezclas del biodiésel de toronja con diésel petroquímico en proporciones 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 y 50:50 (diésel:biodiésel v/v) cuya notación se describe como BX donde la “B” se refiera al biodiésel y la “X” al porcentaje usado de éste. Las mezclas se prepararon con el propósito de conocer la variación de la viscosidad, densidad y calor de combustión a diferentes temperaturas.

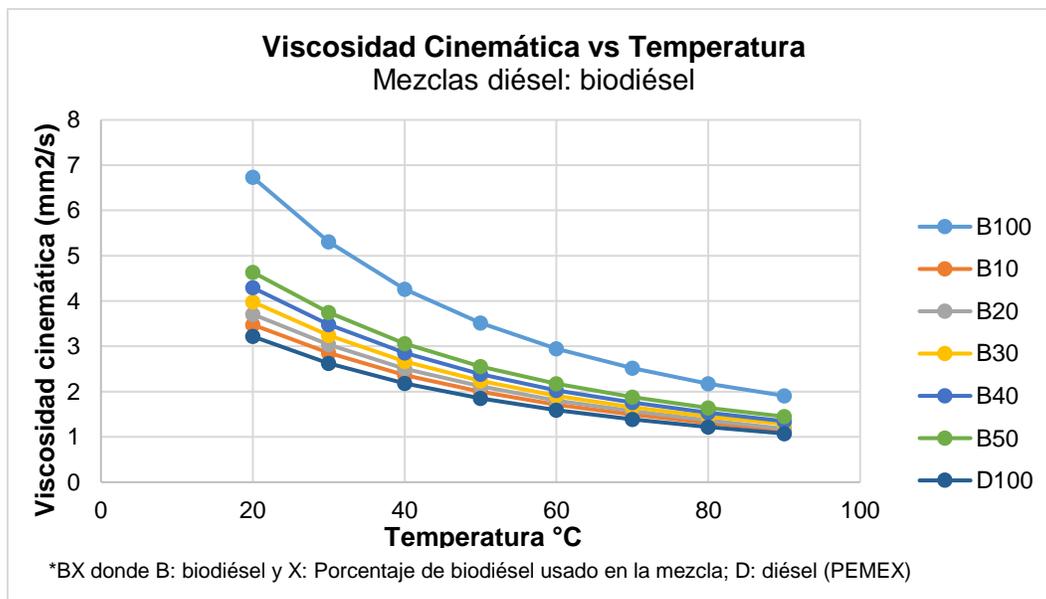
La naturaleza química diferente del biodiésel y el diésel puede causar diferencias en las propiedades físico-químicas que afectarán el rendimiento del motor y las emisiones contaminantes producidas (Moser, 2009). En la actualidad, las mezclas de diésel: biodiésel se consideran el combustible alternativo más factible para su empleo y son las mezclas hasta el 20% de biodiésel mezclado con gasóleo las más empleadas (Silitonga *et al.*, 2013).

Para preparar las mezclas se utilizó el biodiésel producido del aceite extraído por maceración de las semillas de toronja y diésel petroquímico de PEMEX (Petróleos Mexicanos). En la Gráfica 10 se muestra el comportamiento de la densidad de las diferentes mezclas realizadas, así como su modificación al aumentar la temperatura. B0 En dicha gráfica se puede notar el aumento de la densidad relativa al incrementar el porcentaje de biodiésel, pero al aumentar la temperatura la densidad del diésel, biodiésel y mezclas disminuye.



Gráfica 10. Variación de la densidad en las mezclas diésel: biodiésel en función de la temperatura

En general el diésel petroquímico es menos viscoso que el biodiésel, como resultado las mezclas diésel:biodiésel afectan las viscosidades cinemáticas (Silitonga *et al.*, 2013), como se puede ver en la Gráfica 11 a medida que el porcentaje de biodiésel aumenta la viscosidad también lo hace, y al elevar la temperatura éste parámetro disminuye con un comportamiento asintótico.



Gráfica 11. Variación de la viscosidad cinemática en las mezclas diésel:biodiésel en función de la temperatura

Ya que las mezclas con mayor empleo son aquellas cuya proporción de biodiésel no rebasan el 20%, las normas existentes se basan justamente en ese intervalo porcentual de diésel: biodiésel. Por lo anterior, se efectuó una comparación de los valores de viscosidad y densidad de las mezclas con las normas EN 590 la cual describe las propiedades que debe cumplir el biodiésel B100 y ASTM D7467-08 que indica las especificaciones para mezclas de diésel: biodiésel que contienen entre 6% y 20% de biodiésel, para ser usadas en motores. En la Tabla 11 se encuentran los intervalos establecidos por las normas EN 590 y ASTM D7467-08 para mezclas B7, B10 Y B20 en donde se puede corroborar que las mezclas del biodiésel de toronja con diésel petroquímico cumplen con las especificaciones de viscosidad y densidad. También es posible observar que pese a que las mezclas B30, B40 y B50 corresponden a proporciones mayores de biodiesel, éstas también se encuentran entre los intervalos de las dos normas

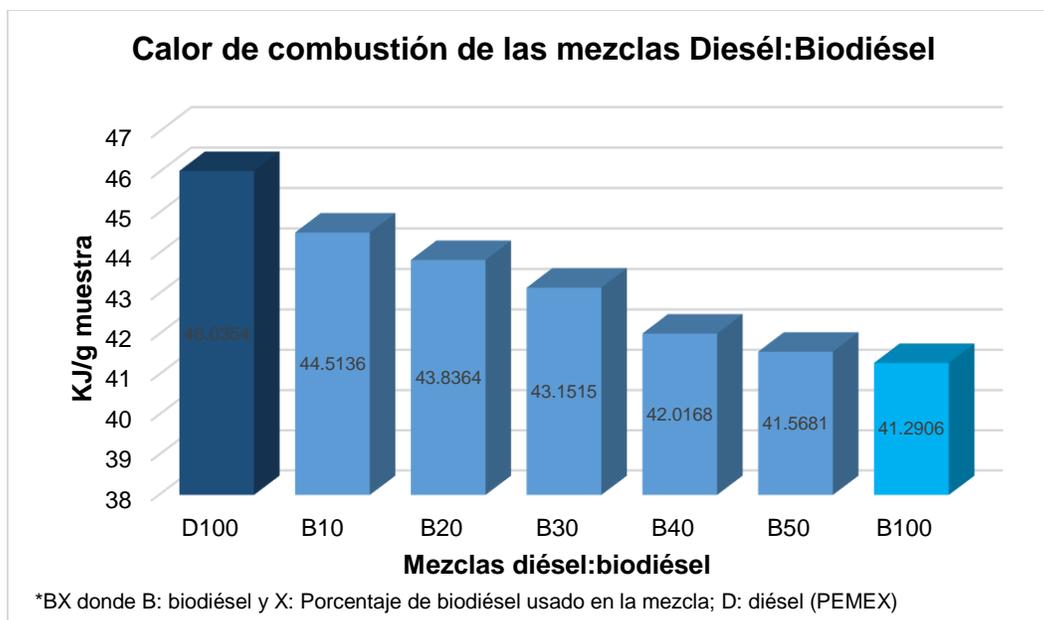
Tabla 11. Normas EN 590 y ASTM D767-08 para mezclas B5 Y B20

Mezcla diésel:biodiésel	Densidad 20 °C	Viscosidad mm²/s 40°C
B10	0.8257	2.3646
B20	0.8313	2.5037
B30	0.8374	2.6636
B40	0.8434	2.8542
B50	0.8496	3.0604
EN 590	0.820-0.845	2.0-4.5
ASTM D7467-08	-	1.9-4.1

** BX donde B: biodiésel y X: Porcentaje usado en la mezcla*

La norma EN 590 contempla mezclas B10 y B20 mientras que la y ASTM D7467-08 incluye los intervalos para mezclas B5 Y B20

El calor de combustión es la cantidad de energía liberada por la combustión de un valor unitario de biocombustible (Silitonga *et al.*, 2013), en la Gráfica 12 se observa que el calor de combustión del biodiésel obtenido B100 es menor al del diésel convencional D100 y que a medida que se incrementa la cantidad de biodiésel a la mezcla este valor disminuye.



Gráfica 12. Variación del calor de combustión en las mezclas diésel:biodiésel en función de la temperatura

Dado que la entalpía de combustión de las mezclas se encuentran entre los obtenidos del biodiésel puro y del diésel petroquímico, las dos mezclas con menor diferencia al calor de combustión del diésel petroquímico son B10 y B20. Es importante mencionar que el valor calórico del combustible es el factor más grande de la economía del combustible, torque y potencia.

3.7 Detección de ciclopéptidos en el bagazo de la semilla de toronja (*Citrus paradisi*)

Para aprovechar los residuos de toronja de forma completa se incluyó un análisis para la identificación de ciclopéptidos en el bagazo de la semilla de toronja generado tras la extracción del aceite usado en la transesterificación para la producción de biodiésel. Para la identificación de ciclopéptidos se realizó una maceración de 100 g de bagazo de toronja con 600 mL de etanol, 400 mL de agua y 1 mL de ácido acético durante 9 días, trascurrido el tiempo del macerado se eliminó el disolvente con el empleo de un evaporador rotatorio.

Una vez conseguido el extracto del bagazo se realizó una prueba de cromatografía en capa delgada para la identificación de péptidos lineales y aminoácidos, en donde la muestra del extracto se disolvió en metanol para posteriormente ser colocada en una cromatoplaca junto al testigo L- valina para péptidos lineales y aminoácidos, y 2,4-piperazindiona para ciclopéptidos, el eluyente que se utilizó fue una mezcla de MeOH: CH₂Cl₂: H₂O (7:2:gota) y se reveló con una solución de ninhidrina y calentamiento de la cromatoplaca. La prueba resulto positiva para la presencia de péptidos lineales y aminoácidos, y es que los aminoácidos terminales de los péptidos reaccionan con ninhidrina, produciendo un complejo de coloración rosa (Fig. 14).

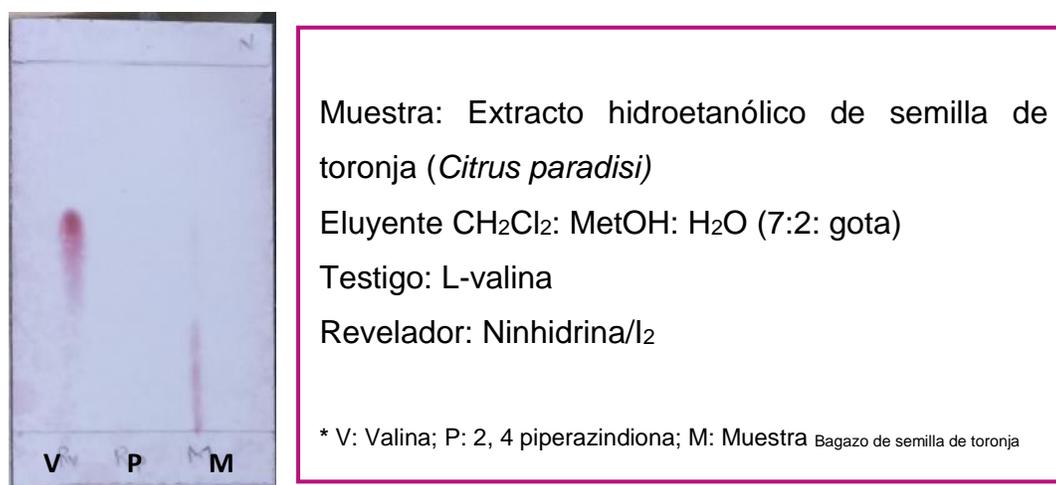


Figura 14. Cromatoplaca con Ninhidrina, prueba para péptidos y aminoácidos

En la cromatoplaca mostrada en la Figura 14 se observa como hay una marca de color rosa en el testigo L-valina y en la muestra, pero no para el testigo 2,4-piperazindiona usado para la identificación de ciclopéptidos.

Una vez que se confirmó la presencia de péptidos lineales y aminoácidos, se realizó nuevamente una cromatografía en capa delgada con un segundo método, esta vez con el propósito de identificar la presencia de ciclopéptidos, para ello se disolvió el extracto en metanol y se utilizó de nuevo como testigo L-valina y 2,4-piperazindiona, la placa fue colocada en una cámara de NaClO durante 90 minutos y después se dejó evaporar el excedente de cloro 24 horas para evitar falsos positivos, finalmente la placa se roció con una solución de o-tolidina, para ser revelada.

La prueba resultó positiva dada la presencia de una coloración azul en la placa para el testigo 2,4-piperazindiona y la muestra (Fig. 15), además de no presentar ninguna marca de color en el testigo L-valina y es que la prueba se basa en la reacción de los grupos amino de los ciclopéptidos con el cloro, para formar cloro-aminas, que al reaccionar con la o-tolidina generan un complejo de color azul-violeta (Greig y Leaback, 1960).

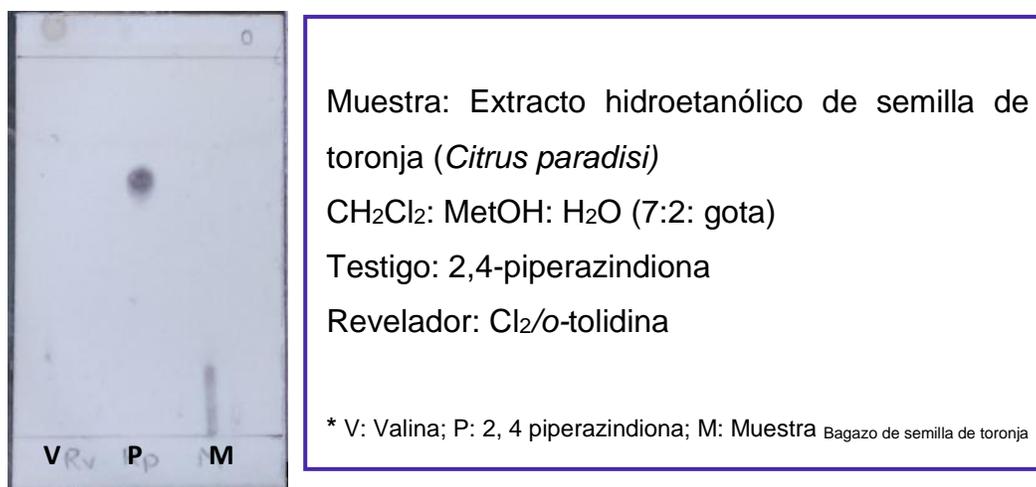


Figura 15. Cromatoplaque con Cl₂/ o-tolidina, prueba para ciclopéptidos

Una vez identificada la presencia de ciclopéptidos en el bagazo de la semilla de toronja por cromatografía en capa delgada se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H), para confirmar las pruebas realizadas e identificar el ciclopéptido.

CONCLUSIONES

1. Se extrajo el aceite de las semillas de toronja con un rendimiento de 30.34%, con la finalidad de producir biodiésel, que cumpla con los parámetros de calidad establecidos en normas internacionales
- 2.- El aceite extraído de semillas de toronja no presenta inconvenientes para ser sometido a una transesterificación en medio básico puesto que su índice de acidez es menor al 3%
3. La caracterización fisicoquímica del biodiésel, probó que éste cumple con las especificaciones de índice de acidez y yodo, densidad, viscosidad cinemática, y calor de combustión establecido por la norma europea EN 14214/07 para el biodiésel puro (B100), con lo que se comprueba el potencial del aceite de toronja para la producción de un biocombustible alternativo
- 4.- Las mezclas B10 y B20 preparadas durante el proyecto se apegan a lo establecido por la norma EN 590 (biodiésel) y ASTM D7467-08 (para mezclas B5, B10 Y B20)
- 5.- Se demostró que a partir de residuos de toronja se puede producir un biocombustible con bajo impacto perjudicial en el medio ambiente debido a que presenta un ciclo de carbono cerrado

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Zafar, M., Azam, A., Sadia, H., Khan, M.A., y Sultana, S. (2011). Techno-economic Aspects of Biodiesel Production and Characterization. *Energy Sources*, 6: 166-177.
- Ajala, O.A., Aberuagba, F., Odetoye, T.E., y Ajala, A.M. (2015). Biodiesel: Sustainable energy replacement to petroleum-based diesel fuel: A review. *ChemBioEng Rev*, 2 (3): 145-156.
- Ajewole, K. y Adeyeye A. (1993). Characterisation of Nigerian *Citrus* seed oils. *Food Chem*, 47, 77-78.
- Anwar, F., Naseer, R., Bhangar, M., I., Ashraf, S., Naz, T. F. y Adekunle, A. F. (2008). Physico-Chemical Characteristics of *Citrus* Seeds and Seed Oils from Pakistan. *J Am Oil Chem Soc*, 85:321-330.
- Alessandro, T.V., Epifano, F., Fiorito, S., y Genovese, S. (2015). A novel oxyprenylated metabolite in *Citrus paradisi* Macfad. seeds extract. *Biochem Syst Ecol*, 58: 72-74.
- Bankovic-ilic, I.B., Stojkovic, I.J., Stamenkovic, O.S., Veljkovic, V.B., y Hung, Y.T. (2014). Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *J Renew Sustain Ener*, 32: 238-254.
- Bardhan, S.K., Gupta, S., Gorman, M.E., y Haider, M.A. (2015). Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production. *J Renew Sustain Ener*, 51: 506-520.
- Cruz Fernández, M. (2007). Variedades de toronja para suelos arcillo limosos de la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Capo experimental San Luis. Sitio de Negocios Huichihuayán. Folleto para productores Núm. 10. San Luis Potosí, México. 22 p.
- Demirbas, A., Bafail, A., Ahmand W., y Sheikh, M. (2016). Biodiesel production from non-edible plant oils. *Energy Exploration and Exploitation*, 34 (2): 290-318.
- Castejón O.A., y Santamaría H.G. (2011), Energías renovables (Instalaciones solares fotovoltaicas), Editex. pp. 202.
- Díaz Velilla Jorge Pablo. (2015). Sistema de energías renovables. España. Paraninfo. Pp. 19-21.

- Dunn, R.O. (2008). Antioxidants for improving storage stability of biodiesel, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2:304–318.
- El financiero (2014), 5 Graficas que te explican porque hay tanto petróleo en el mercado, Economía [en línea]. Recuperado de: <http://www.elfinanciero.com.mx/economia/graficas-para-entender-la-situacion-del-petroleo.html>. Ultimo acceso: 13 de Julio 2017.
- Espinoza, de A., W., Goddard, J., M., Gutiérrez, A., C. y Bonfil, S., C. (2009). Los biocombustibles. *¿Cómo ves?* Revista de divulgación científica de la UNAM, 123: 10-14.
- FAO (2011). Manual de biogás. Chile [en línea]. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf>. Ultimo acceso: 4 julio 2017.
- Farouk, M., A., R. y Ei-Anany, A., M. (2017). Stabilization of Neem Oil Biodiesel with Corn Silk Extract during Long-term Storage. *J Oleo Sci*, 66: 133-145
- Felizardo, P., Correia, M., Pomposo, I., Mendes, J., Berkemeier, R., Bordado, J. (2006). Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage*, 26: 487-494.
- Fukuda, H., Kondo, A. y Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, 92 (5): 405-416.
- Giroto, F., Alibardi, L., y Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45: 32-41.
- Gerpen, J.V. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol*, 86: 1097-1107.
- Greig, C. G. Leaback, D. H. (1960). Use of chlorine in the detection of compounds on paper chromatograms. *Nature*, 188: 310-311.
- Guerrero, F., C., A., Guerrero, R., A. y Sierra, F., E. (2011). Biodiesel Production from Waste Cooking Oil, *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*, 2:23-44.
- Gürü, M. y Keskin, A. (2016). Evaluation of Biodiesel Production, Engine Performance, and Emissions. *J Electron Mater*, 45 (8): 3882-3888.

- Harish, B.S., Janaki, R.M., y Babu, U.K. (2015). Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. *J Renew Sustain Ener*, 51: 533-547.
- Haseeb, A.S.M.A., Fazal, M.A., y Jahirul, M.I (2011). Compatibility of automotive materials in biodiesel: a review. *Fuel*, 90(3): 922–931.
- Helwani, Z., Othman, M.R., Aziz, N., Fernando, W.J.N. y Kim J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on Green catalytic techniques: A review. *Fuel Process Technol*, 90: 1502-1514.
- Hwa, T., S., Rashid, U., Hin y T., Y., Y., (2014). Biodiesel production from crude *Jatropha Curcas* oil using calcium based mixed oxide catalysts. *Fuel*, 136: 244-252.
- IEA (2016). Key world energy statistics. International Energy Agency [en línea]. Recuperado de: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2016.pdf>. Último acceso: 20 junio 2017.
- Jarauta Rovira Laura. (2014). Las energías renovables. Barcelona, EDITORIAL UOC.
- Kumar, K.S. (2016). Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53: 945-953.
- Knothe, G., y Razon, L.F. (2017). Biodiesel fuels. *Prog Energy Combust Science*, 58: 36-59.
- Leung, D.Y.C., Wu, X., y Leung, M.K.H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl Energy*, 87: 1083-1095.
- Mamma, D. y Christakopoulos, P. (2014). Biotransformation of *Citrus* by products into value added products. *Waste Biomass*, 5: 529-549.
- Meher, L., C., Vidya, S., D. y Naik, S., N. (2004). Technical aspects of biodiesel production by transesterification- a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10: 248–268.
- Modiba, E., Enweremadu, C., y Rutto, H. (2015). Production of biodiesel from waste vegetable oil using impregnated diatomite as heterogeneous catalyst. *Chinese J Chem Eng*, 23: 281-289.

- Moser, B.R. (2009). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *The Society for In Vitro Biology*, 45: 229-266.
- NMX-F-101-1987. Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de acidez. Foods. Vegetables or animals oils and fats. Acidity index determination. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de humedad (método rápido de la termobalanza). Foods. Determination of moisture (thermobalance rapid method). Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-FF-084-SCFI-2009. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruto fresco – nuez pecanera *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch – especificaciones y métodos de prueba (cancela a la NMX-FF-084-SCFI-1996)
- NMX-F-101-SCFI-2012. Alimentos – aceites y grasas vegetales o animales – determinación de ácidos grasos libres - método de prueba (cancela a la NMX-F-101-SCFI-2006)
- Nordbald, M., Pedersen, A. K., Rancke-Madsen, A., y Woodley, J.M. (2016). Enzymatic Pretreatment of Low-Grade Oils for Biodiesel Production. *Biotechnol Bioeng*, 113: 754-760.
- Oyarbide, V., J. (2010). Diseño, síntesis y estudio conformacional de ciclopéptidos β -lactámicos de tipo RGD. Tesis de Doctorado. Departamento de Química Orgánica de la Universidad del País Vasco – Euskal Herriko Unibertsitatea. Pag. 1-14.
- Rashid, U., Ibrahim, M., Yasin, S., Yunus, R., Taufiq-Yap, Y.H., y Knothe, G. (2013). Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock. *Ind Crop Prod*, 45: 355-359.
- Reyes, T. B., Guerra, R. D., Zuleta, P. H., Cuevas, S. J. A., Reyes, L., Reyes, C. A., Rodríguez, S. J. A. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Ind Crop Prod*, 52: 400-404.
- Rodionova, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M., y Allakhverdiev, S.I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int J Energy Res*, 42: 8450-8461.
- Roldán, V.J. (2013). Energías renovables. Lo que hay que saber. España. Paraninfo. pp. 46-50.

- Ruhul, A.M., Kalam, M.A., Masjuki, H.H., Rizwanul F.I.M., Reham, S.S., y Rashed, M.M. (2015). State of the art of biodiesel production processes: a review of the heterogeneous catalyst. *The Royal Society of Chemistry*, 5: 101023-101044.
- Salinas C., E. y Gasca Q., V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*, 157, pp. 75-82. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco Distrito Federal, México
- Saravanan, N., Puhuan, S., Nagarahan, G. y Vedaraman, N. (2010). An experimental comparison of transesterification process with different alcohols using acid catalysts. *Biomass and Bioenergy*, 34: 999-1005.
- Selvaraj, R., Praveenkumar, R., y Moorthy, G. (2016). A comprehensive review of biodiesel production methods from various feedstocks. *Biofuels*, pp. 1-9.
- Semwal, S., Arora, A.K., Badoni, R.P., y Tuli, D.K. (2011). Biodiesel production using heterogeneous catalysts. *Bioresource Technology*, 102: 2151-2161.
- SENER (2013). Prospectiva de petróleo crudo y petrolíferos 2013-2027. Secretaría de energía [en línea]. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62951/Prospectiva_de_Pet_r_leo_y_Petrol_feros_2013-2027.pdf. Último acceso. 17 Junio 2017.
- SENER (2015). Prospectiva de petróleo crudo y petrolíferos 2015-2029. Secretaría de energía [en línea]. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44327/Prospectiva_Petrole_o_Crudo_y_Petroliferos.pdf. Último acceso: 20 junio 2017.
- SIAP (2015). Anuario estadístico de la producción agrícola [en línea]. Recuperado de: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp. Último acceso: 15 Julio 2017.
- Silitonga, A. S., Masjuki, H. H., Mahlia, T. M. I. y Ong, H. C., Chong, W. T. y Boosroh, M.H. (2013). Overview properties of biodiesel diesel blends from edible and non-edible feedstock. *J Renew Sustain Ener*, 22: 346-360.
- Singh, R. K. and Padhi, S. K. (2009). Characterization of jatropha oil for the preparation of biodiesel. *Natural Product Radiance* 8(2): 127–132.

- Singh, A., Olsen, S.I., y Singh, N. P. (2011). A viable technology to generate third-generation biofuel. *J Chem Technol Biotechnol*, 86: 1349-1353.
- Smith, P., W., G. (1957). *cyclo*(Glycylglycyl-DL-prolyl), *J Chem Soc*, 790: 3985-3988.
- Souza, S.P., Seabra, J. E. A., y Horta, N. L. A. (2017). Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. *Biofuels*. pp. 1-24.
- Supple, B., Howard, H., R., Gonzalez, G., E. y Leahy, J., J. (2002). The Effect of Steam Treating Waste Cooking Oil on the Yield of Methyl Ester. *JAOCS*, 79: 175-178.
- Taher, H. y Al-Zuhair, S. (2016). The use of alternative solvents in enzymatic biodiesel production: a review. *Biofuel Bioprod Bior*, 11:168-194.
- Tan, N.H., y Zhou, J. (2006). Plant Cyclopeptides. *Chem Rev*, 106 (3): 840-895.
- Tariq, M., Ali, S., y Khalid, N. (2012). Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: A review. *J Renew Sustain Ener*, 16: 6303-6316.
- Tüccar, G., Tosun, E. Ozgür, T., y Aydin, K. (2014). Diesel engine emissions and performance from blends of *Citrus sinensis* biodiesel and diesel fuel. *Fuel*, 132: 7-11.
- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B.S., y Odabas, K.E. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Int J Food Sci Tech*, 46: 1455-1461.
- Vera, A., (2014). Obtención de aceite de semilla de chía (*Salvia hispanica*) y su transformación a biocombustible. *Tesis para obtener el título de Química de Alimentos*, División de estudios de Posgrado, Facultad de Química. Pag. 1-35.
- Verma, P., y Sharma M.P. (2016). Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *J Renew Sustain Ener*, 62: 1063-1071.
- WEC (2013). Recursos energéticos globales. World Energy Council [en línea]. Recuperado de: <https://www.worldenergy.org/wp-content/uploads/2014/04/Traduccion-Estudio-Recursos-Energeticos1.pdf>. Ultimo acceso: 20 de julio 2017.

- Wen, Y. X., Jun, T., Chang, J.J., Wen, J.H., y Ning, H.T. (2008). Application of a TLC chemical method to detection of cyclotides in plants. *Chinese Sci Bull*, 53 (11): 1671-1674.
- Zakaria, H., Khalid A., Farid, S., M., Mustafa, N., (2014). Overview Effect Of Biodiesel Storage On Properties And Characteristics. *Applied Mechanics and Materials*, 465-466: 260-264
- Zhanying, Z., O´Hara, I., M., Mundree, S., Gao, B., Ball, A., S., Zhu, N., Bai, Z. y Jin, B. (2016). Biofuels from food processing wastes. *Curr Opin Biotech*, 38: 97-105.
- Zhou, J., y Tan, N.H. (2000). Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chinese Sci Bull*, 45(20): 1825—1831.

ANEXOS

Anexo A. Composición bromatológica de la toronja (*Citrus paradisi*)

Anexo B. RMN ^1H de aceite de semilla de toronja (*Citrus paradisi*) extraído por maceración

Anexo C. RMN ^1H del Biodiésel obtenido de la transesterificación del aceite de semilla de toronja (*Citrus paradisi*)

Anexo D. Cromatograma de ésteres metílicos en Biodiésel obtenido de las semillas de toronja

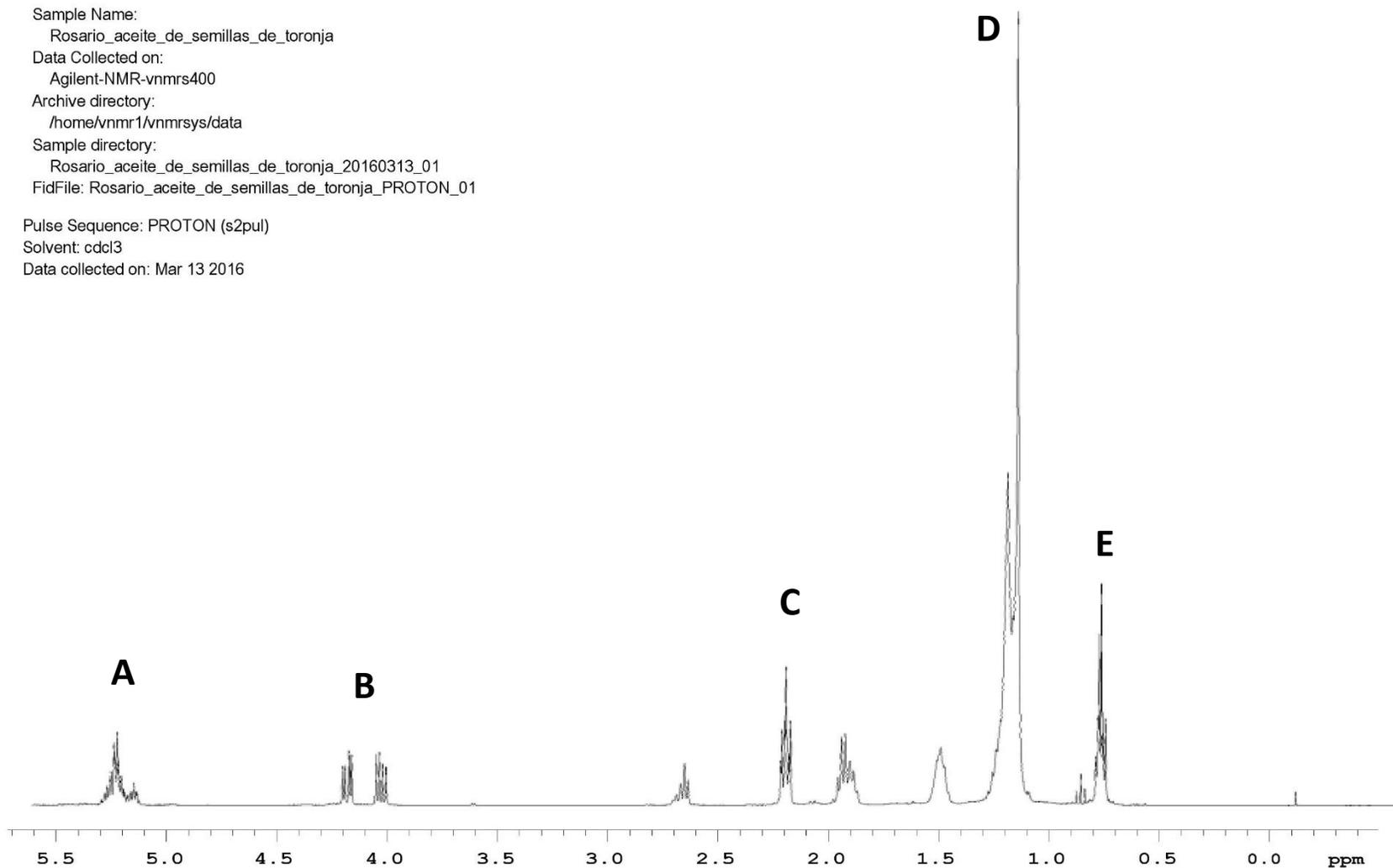
ANEXO A

Composición bromatológica de la toronja (*Citrus paradisi*)

Composición	Cantidad por 100 g de porción comestible
Agua (g)	88.4
Proteínas (g)	0.6
Lípidos (g)	0.1
Carbohidratos (g)	9.8
Calorías (kcal)	39
Vitamina A U. I.	80
Vitamina B1 (mg)	0.04
Vitamina B2 (mg)	0.02
Vitamina B6 (mg)	0.02
Ácido nicotínico (mg)	0.2
Ácido pantoténico (mg)	0.25
Vitamina C (mg)	40
Ácido málico (mg)	80
Ácido fólico (mcg)	18
Ácido cítrico (mg)	1460
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	198
Calcio (mg)	17
Magnesio (mg)	10
Fósforo (mg)	16
Otros (mg)	8.33

Fuente: Cruz, 2007

Sample Name:
Rosario_aceite_de_semillas_de_toronja
Data Collected on:
Agilent-NMR-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Rosario_aceite_de_semillas_de_toronja_20160313_01
FidFile: Rosario_aceite_de_semillas_de_toronja_PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 13 2016

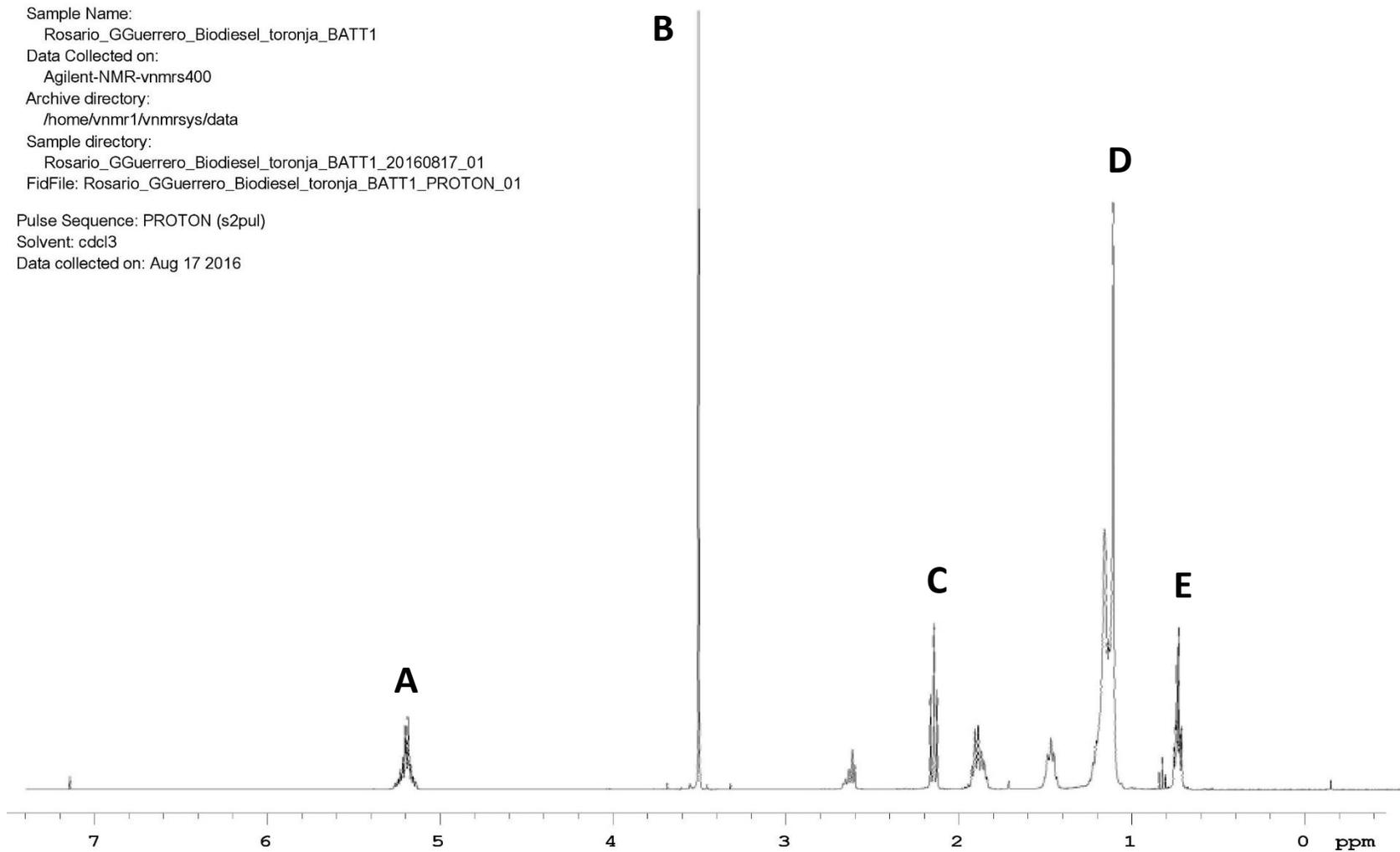


ANEXO B. RMN ¹H de aceite de semilla de toronja (*Citrus paradisi*)

[A] CH=CH; [B] Hidrogeno base del triglicerido; [C] _OCO-CH₂_ ; [D] -(CH₂)n- ;[E] CH₃

Sample Name:
Rosario_GGuerrero_Biodiesel_toronja_BATT1
Data Collected on:
Agilent-NMR-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Rosario_GGuerrero_Biodiesel_toronja_BATT1_20160817_01
FidFile: Rosario_GGuerrero_Biodiesel_toronja_BATT1_PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 17 2016



ANEXO C. RMN ^1H del Biodiésel obtenido de la transesterificación del aceite de semilla de toronja (*Citrus paradisi*)

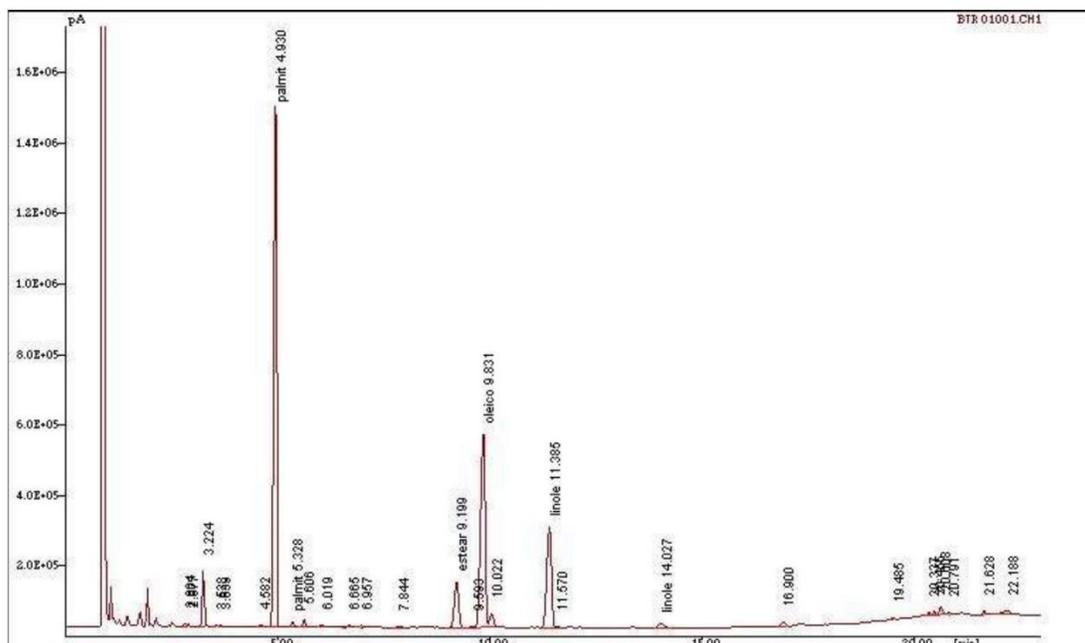
[A] $\text{CH}=\text{CH}$; [B] $\text{R}-\text{COO}-\text{CH}_3$; [C] $-\text{OCO}-\text{CH}_2-$; [D] $-(\text{CH}_2)_n-$; [E] CH_3



Laboratorio de Cromatografía
LSA del Instituto de Química, UNAM
Certificado ISO 9001:2008 RSGC 238

Informe de Resultados

29 de junio de 2016



Archivo : C:\HP3398A\datos\BTR 01001.CH1

Operador : Lucero Rios

Nombre del sistema : Agilent 6890

Información : BTR 01 160627-ext-04 STE 6331

Columna AT-FAME 30m x 0.25mm x 0.25 um espesor de película

Temperatura Inyector 250 °C Temperatura FID 250 °C

Horno 180 °C [15 min] 10 °C/min hasta 230 °C [3 min]

Flujo 1.8 ml/min H2 Split 100

Fecha de inyección : 28-Jun-2016 16:12:26

Tiempo de adquisición : 23.00 [min]

Método de Control : ESTERES FAME2

Método de análisis : FAME

Modo de Cálculo : % Área

ANEXO D. Cromatograma de ésteres metílicos en Biodiésel obtenido de las semillas de toronja



Laboratorio de Cromatografía
LSA del Instituto de Química, UNAM
Certificado ISO 9001:2008 RSGC 238

Informe de Resultados

29 de junio de 2016

#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área	Código
1		2.804	10497	0.099	VV
2		2.877	11074	0.104	PV
3		3.224	289018	2.721	VV
4		3.528	11082	0.104	VV
5		3.639	11871	0.112	VV
6		4.582	20951	0.197	VV
7	palmitico	4.930	4056349	38.184	BV
8	palmitoleico	5.328	35838	0.337	VV
9		5.606	54909	0.517	VV
10		6.019	24826	0.234	VV
11		6.665	18352	0.173	PV
12		6.957	12507	0.118	BV
13		7.844	16690	0.157	PB
14	estearico	9.199	676843	6.371	BV
15		9.593	15910	0.150	PV
16	oleico	9.831	3047716	28.689	VV
17		10.022	184906	1.741	VV
18	linoleico	11.385	1655563	15.584	VV
19		11.570	11806	0.111	VV
20	linolenico	14.027	80871	0.761	BV
21		16.900	48624	0.458	BB
22		19.485	12945	0.122	MM
23		20.337	29212	0.275	MM
24		20.455	31342	0.295	BB
25		20.608	94256	0.887	BB
26		20.791	15127	0.142	BB
27		21.628	29491	0.278	MM
28		22.188	114668	1.079	BB

ANEXO 4. Cromatograma de ésteres metílicos en Biodiésel obtenido de las semillas de toronja